

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**“TRANSFERENCIA GENÉTICA HORIZONTAL DE ROD21,
UNA ISLA DE PATOGENICIDAD INESTABLE PRESENTE EN
EL CROMOSOMA DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR
ENTERITIDIS”**

FRANCISCO JAVIER SALAZAR ECHEGARAI

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

**Director de Tesis
Prof. Dra. Susán Bueno R.**

**Director de Tesis
Prof. Dr. Roberto Vidal A.**

2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

FRANCISCO JAVIER SALAZAR ECHEGARAI

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día de 2014.

Prof. Dra. Susan Bueno Ramírez

Director de Tesis

**Depto. Genética Molecular y Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile**

Prof. Dr. Roberto Vidal Álvarez

Director de Tesis

**Programa de Microbiología y Micología, ICBM
Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Carlos Santiviago

Prof. Dr. Omar Orellana

Prof. Dr. James Robeson

**Prof. Dr. Germán Hermosilla
Presidente Comisión**

ÍNDICE

Resumen	6
Abstract	8
1. Introducción	10
1.1 Transformación bacteriana.....	10
1.2 Transducción.....	11
1.3 Conjugación.....	12
1.4 Transferencia lateral de genes en <i>Salmonella</i>	13
1.5 La isla de patogenicidad ROD21.....	14
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
2. Materiales y Métodos	19
2.1 Materiales	19
2.1.1 Cepas y plásmidos.....	19
2.1.2 Biología molecular.....	19
2.2 Métodos	22
2.2.1 Condiciones de cultivo.....	22
2.1.2 Cultivos bacterianos.....	22
2.2.3 Inserción de genes de resistencia mediante doble recombinación homóloga.....	22
2.2.4 Transducción de genes de resistencia a cepas de <i>S. Enteritidis</i> PT1...	23
2.2.5 Transferencia de ROD21 en medio líquido.....	24
2.2.6 Tratamientos con H ₂ O ₂ , temperatura y pH.....	24
2.2.7 Transferencia de ROD21 en filtro.....	25

2.2.8	Transferencia de ROD21 mediante transformación natural, utilizando concentraciones conocidas de ADN.....	25
2.2.9	Determinación de la transferencia de ROD21 mediante transducción..	26
2.2.10	Extracción de ADN de bacterias.....	26
2.2.11	Reacción en cadena de la polimerasa.....	27
2.2.12	Ensayos de virulencia en ratones infectados con <i>Salmonella</i>	30
2.2.13	Análisis estadísticos.....	30
3.	Resultados.....	31
3.1	Generación de una cepa dadora de ROD21.....	31
3.2	Generación de una cepa de <i>S. Enteritidis</i> receptora de ROD21.....	33
3.3	Generación de una cepa de <i>S. Typhimurium</i> receptora de ROD21.....	35
3.4	Generación de cepas de <i>E. coli</i> receptoras de ROD21.....	37
3.5	Transferencia de ROD21 a cepas de <i>Salmonella</i> receptoras.....	40
3.6	Transferencia de ROD21 a cepas de <i>E. coli</i> receptoras.....	44
3.7	Determinación del mecanismo de transferencia de ROD21.....	45
3.7.1	Transferencia de ROD21 en filtro.....	45
3.7.2	Transferencia de ROD21 a partir de ADN de la cepa dadora	46
3.7.3	Transferencia de ROD21 a partir de sobrenadante.....	47
3.7.4	El proceso de transferencia requiere de la escisión precisa de ROD21 y de complementación en <i>trans</i> para llevarse a cabo.....	47
3.8	Efecto de condiciones ambientales en la transferencia de ROD21.....	48
3.9	Virulencia de cepas de <i>S. Typhimurium</i> que adquirieron ROD21.....	52
4.	Discusión.....	54
5.	Conclusiones.....	60
5.	Bibliografía.....	61

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

2.1	Cepas, fagos y plásmidos.....	20
2.2	Programa de PCR.....	27
2.3	Partidores y sondas.....	28

Figuras

1.1	Esquema de la isla de patogenicidad ROD21.....	16
3.1	Obtención de la cepa dadora <i>S. Enteritidis</i> PT1 ROD21:: <i>aph</i>	32
3.2	Generación de cepa receptora <i>S. Enteritidis</i> PT1 Δ ROD21 <i>putA::cat</i>	34
3.3	Generación de cepa receptora <i>S. Typhimurium</i> 14028s <i>putA::cat</i>	36
3.4	Secuencias nucleotídicas de <i>asnT</i> de <i>S. Enteritidis</i> PT4, <i>S. Typhimurium</i> 14028s, <i>E. coli</i> EDL933 y <i>E. coli</i> H10407.....	37
3.5	Generación de cepa receptora <i>E. coli</i> H10407 <i>putA::cat</i>	38
3.6	Generación de cepa receptora <i>E. coli</i> EDL933 <i>putA::cat</i>	39
3.7	Genotipo de bacterias que han adquirido ROD21.....	42
3.8	Identificación de clones de <i>S. Typhimurium</i> que adquirieron ROD21.....	44
3.9	Frecuencia de transferencia de ROD21 a cepas de <i>S. Enteritidis</i> y <i>S. Typhimurium</i>	46
3.10	Efecto de condiciones ambientales en la transferencia de ROD21.....	51
3.11	Efecto de condiciones ambientales en la escisión de ROD21.....	52
3.12	Supervivencia de ratones infectados con <i>S. Typhimurium</i> que adquirió ROD21.....	53

RESUMEN

Las bacterias pueden obtener material genético foráneo a través de un proceso denominado transferencia genética horizontal (TGH). Mediante este proceso las bacterias adquieren rápidamente nuevas características que favorecen su supervivencia y es uno de los principales motores en la evolución bacteriana.

Uno de los casos donde la TGH ha jugado un rol importante en la generación de diversidad es en el género *Salmonella*, donde actualmente se han reportado más de 2.500 serovares. Unos de los serovares de importancia en salud humana es el serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), ya que afecta a un amplio rango de hospedero, incluyendo al hombre y animales de importancia comercial. Elementos genéticos presentes en estas bacterias, como ciertas islas de patogenicidad y profagos, son inestables y por lo tanto son potencialmente transferibles a otras bacterias del medio donde se encuentren. En nuestro laboratorio hemos identificado una isla de patogenicidad inestable en el cromosoma de *S. Enteritidis*, denominada ROD21. ROD21 posee un tamaño de 26,5 kb y se encuentra en una región que posee tres copias del gen que codifica el tRNA de asparragina (*asnT*). Esta isla de patogenicidad contiene al gen *t1pA*, involucrado en la virulencia de la bacteria. En experimentos previos hemos demostrado que la isla ROD21 es capaz de escindirse del cromosoma de *S. Enteritidis* en medio de cultivo LB. Además, esta capacidad de escisión aumenta cuando la bacteria es sometida a tratamientos con peróxido de hidrógeno, dando indicios de que ciertas condiciones ambientales influyen en la escisión.

Para determinar si ROD21 es capaz de transferirse a otras bacterias, se generó una cepa dadora que poseía un gen de resistencia a kanamicina en ROD21 (*S. Enteritidis* ROD21::*aph*) y también se generaron cepas receptoras de *S. Enteritidis* carentes de ROD21 (Δ ROD21), *S. Typhimurium*, *E. coli* H10407 y *E. coli* EDL933, las que poseían el gen de resistencia a cloranfenicol inserto río abajo del gen *putA*. Se realizaron ensayos de transferencia en medio líquido, donde se obtuvo frecuencias de transferencia de $2,2 \times 10^{-7}$ por dadora para *S. Enteritidis* y $3,2 \times 10^{-8}$ por dadora para *S. Typhimurium*. Para *E. coli* no se obtuvo bacterias que integraran ROD21 en su genoma. Posteriormente, mediante ensayos de transferencia en filtro, se determinó que la movilización de la isla ocurre mediante un proceso conjugativo, obteniendo mayores frecuencias de transferencia que en medio líquido. Además, se descartó que el proceso de transferencia ocurriera por transformación natural o transducción. Finalmente, se analizó el efecto de ciertas condiciones ambientales que pudiesen afectar la transferencia de ROD21, observando que la temperatura y pH logran aumentar la frecuencia de transferencia. Estos datos indican que ROD21 es una isla de patogenicidad inestable capaz de transferirse a otras bacterias mediante conjugación, siendo este un evento especie-específico y que es afectado por factores ambientales, que podrían influir tanto en el ciclo natural de la bacteria, como en un proceso infeccioso, asegurando la mantención de ROD21 dentro de la población.

ABSTRACT

Horizontal gene transfer of ROD21: an unstable pathogenicity island present in the chromosome of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

Bacteria can obtain foreign genetic material through a process called horizontal gene transfer (HGT). Through this process, bacteria rapidly acquire new traits that favor their survival and is one of the main drivers in bacterial evolution.

One case where HGT has played an important role in the generation of diversity is in the genus *Salmonella enterica*, where currently more than 2,500 serovars are reported. One of the serovars of importance in human health is serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), affecting a wide host range, including humans and animals of commercial importance. Genetic elements present in these bacteria, like certain pathogenicity islands and prophages, are unstable and therefore are potentially transferable to other bacteria in the environment. In our laboratory we have identified an unstable pathogenicity island in the chromosome of *S. Enteritidis*, called ROD21. ROD21 is 26.5 kb in size and is located in a region that has three copies of the gene coding for asparagine tRNA (*asnT*-tRNA). This pathogenicity island contains the gene *tlpA*, involved in the virulence of the bacteria. Previous experiments have shown that the island suffers excision from the chromosome of *S. Enteritidis* in LB medium. In addition, this phenomenon increases when the bacteria is subjected to treatment with hydrogen peroxide, providing evidence that certain environmental conditions would influence the excision event.

To determine whether ROD21 is able to transfer to other bacteria, we generated a donor strain that had a kanamycin resistance gene in ROD21

(*S. Enteritidis* ROD21::*aph*), and also generated recipient strains of *S. Enteritidis* lacking ROD21 (Δ ROD21), plus *S. Typhimurium*, *E. coli* H10407, and *E. coli* EDL933, which possessed the chloramphenicol resistance gene inserted downstream the *putA* gene. Transfer assays were performed in liquid medium, which yielded transfer frequencies of 2.2×10^{-7} per donor for *S. Enteritidis* and 3.2×10^{-8} per donor for *S. Typhimurium*. For *E. coli*, there were no bacteria that integrated ROD21 into their genome. Subsequently, by filter-mating assays, it was determined that the mobilization of the island occurs through a conjugative process, achieving higher transfer frequencies than in liquid medium. Furthermore, we confirmed that the transfer process does not occur by natural transformation or transduction. Finally, we analyzed the effect of certain environmental conditions that could affect ROD21 transfer, and found that the temperature and pH are able to increase the frequency of transfer. These data indicate that ROD21 is an unstable pathogenicity island that can be transferred to other bacteria by conjugation, being a species-specific event that is affected by environmental factors that might influence both the natural cycle of bacteria and the infective process, ensuring the maintenance of ROD21 within the population.

1.- INTRODUCCIÓN

Los genomas de las especies bacterianas pueden evolucionar a través de diversos procesos, como mutaciones, rearrreglos cromosomales, deleciones de uno o varios genes o adquisición de material genético, mediante transferencia genética horizontal (TGH) (1). La pérdida o ganancia de material genético genera cambios genómicos que pueden alterar rápida y radicalmente el estilo de vida de la bacteria, como por ejemplo la conversión de una bacteria inocua en patógena por conversión lisogénica (2, 3). Estos últimos mecanismos parecen ser los principales por los cuales las bacterias se adaptan genéticamente a nuevos ambientes, teniendo una fuerte repercusión especialmente en la aparición de bacterias patógenas. Los procesos de flujo horizontal de genes incluyen elementos genéticos móviles como plásmidos conjugativos, elementos integrativos conjugativos, transposones, secuencias de inserción, profagos, integrones e islas genómicas (4-6).

Se habla de TGH cuando una bacteria es capaz de incorporar material genético proveniente de una fuente externa. Las bacterias obtienen comúnmente nuevas secuencias de ADN por 3 mecanismos que se detallan a continuación:

1.1 Transformación bacteriana: La transformación es la captación estable, integración y expresión de ADN extracelular que ocurre en la naturaleza cuando las especies bacterianas se encuentran en un estado fisiológico conocido como competencia (7). La transformación natural ha sido demostrada en muchas arqueas y subdivisiones bacterianas (8, 9). La liberación y persistencia de ADN extracelular, la presencia de células competentes y la capacidad del ADN para ser integrado al cromosoma bacteriano son las condiciones necesarias para que la transformación natural ocurra (5). Se ha reportado que la respuesta SOS inducida por antibióticos

mediante daño al ADN favorece la transformación bacteriana y promueve la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (10).

1.2 Transducción: La transducción es un mecanismo de transferencia de material genético de una bacteria a otra mediada por un bacteriófago (fago). Los fagos son virus especializados que infectan bacterias (11) y tienen un rango limitado de hospederos, por lo tanto la transducción es un evento específico de TGH (12). Existen dos tipos de bacteriófagos, dependiendo de su ciclo de vida: 1) líticos, que son capaces sólo de infectar bacterias y producir más fagos con la destrucción de la célula hospedera y 2) lisogénicos, que son capaces de integrarse en el genoma de la bacteria hospedera y convertirse en parte de su material genético (11). Bajo estas condiciones, el bacteriófago es conocido como profago (5). La conversión lisogénica ocurre cuando los genes transferidos confieren inmunidad a la bacteria receptora para ser infectada por el mismo fago u otro similar y, en algunas ocasiones, altera el fenotipo de la bacteria receptora otorgándole ventajas adaptativas, como genes de virulencia que lleva consigo (2, 13). La importancia de la propagación de genes de virulencia mediante conversión lisogénica ha sido evidente sólo desde hace algunos años. Por ejemplo, se ha demostrado que los genes que codifican la toxina Shiga, *stx1* y *stx2* son transferibles desde una cepa de *E. coli* a otra mediante bacteriófagos (14). La incorporación del ADN circular del fago al cromosoma bacteriano se realiza mediante un proceso de recombinación entre una secuencia específica del bacteriófago (conocida como secuencia *attP*) y una secuencia del cromosoma bacteriano (conocida como secuencia *attB*) (15). Ambas secuencias poseen un largo de entre 16 a 20 pb y además poseen sobre un 90% de identidad. La recombinación de estas secuencias requiere la presencia de una integrasa, que cataliza una

recombinación del tipo sitio-específica entre los sitios *attP* y *attB* (16). La recombinación entre estas dos secuencias produce la integración del ADN del fago en el cromosoma bacteriano, quedando las secuencias *attB* y *attP* flanqueando al profago. Estas secuencias se denominan *attL* y *attR* (17). El ciclo lítico puede ser inducido en profagos bajo ciertas condiciones ambientales, como la respuesta SOS (18, 19), donde se produce la escisión del genoma del bacteriófago desde el cromosoma bacteriano (17). Este proceso es catalizado también por la integrasa, pero además se requiere de la acción de una segunda proteína, denominada excisionasa, para producir la recombinación inversa entre la secuencia *attL* y *attR* (15, 17).

1.3 Conjugación: La TGH mediante conjugación es utilizada por ciertos plásmidos y por elementos conjugativos e integrativos (ICE's) (20). La conjugación requiere del contacto célula-célula y de proteínas específicas que median el proceso de transferencia y la creación del poro de conjugación. Muchos plásmidos no pueden transferirse de forma autónoma, pero pueden ser movilizados de una bacteria a otra en presencia de un plásmido auto-transferible mediante el uso de proteínas de movilización (5, 7).

El mecanismo molecular de transferencia de ADN por conjugación ha sido ampliamente estudiado, especialmente en Proteobacterias. La región de ADN transferible (usualmente plásmidos que codifican su propio aparato de conjugación) debe contener un origen de transferencia (*oriT*), una secuencia de ADN corta donde el proceso tiene comienzo y fin (21). El resto de la maquinaria conjugativa consiste de al menos 15 proteínas que llevan a cabo diversas funciones, incluyendo el procesamiento de ADN y el transporte hacia la bacteria receptora (22). Las proteínas

de la maquinaria conjugativa se puede considerar como 3 módulos funcionales: 1) el *selector de sustrato*, que consiste de un complejo nucleoprotéico, también llamado relaxosoma, formado por el *oriT*, una relaxasa y una o más proteínas accesorias. La relaxasa corta específicamente el *oriT* en la hebra de ADN que será transferida, permaneciendo unida covalentemente a la hebra cortada, donde se cree que ocurre la ligación al final del proceso de transferencia. 2) El conducto transmembrana es un complejo multiproteico formado por cerca de 10 proteínas, que se extiende a través de la membrana interna y externa. Sus componentes pertenecen a la familia de proteínas transportadoras del sistema de secreción tipo IV (23, 24). 3) Las proteínas de acoplamiento unen al selector y el conducto, aproximando ambas partes de la maquinaria de transferencia. Además, basado en su estructura y similitud con otros transportadores de ADN, se propone que expulsa activamente la hebra de T-ADN, correspondiente al ADN que es susceptible de ser transferido, desde la bacteria dadora a la receptora (25).

Se ha reportado que ciertas condiciones ambientales influyen en la transferencia de material genético de una bacteria a otra, pudiendo ser estos factores tanto bióticos como abióticos, como por ejemplo: densidad celular, concentración de carbón orgánico, temperatura, catecolaminas, todo esto en condiciones ambientales o durante un proceso infeccioso (26-28).

1.4 Transferencia lateral de genes en *Salmonella*

Uno de los casos más interesantes de TGH se observa en *Salmonella enterica*, debido a la gran cantidad de plásmidos, islas genómicas y profagos que contiene su material genético, los cuales han sido incorporados presumiblemente por TGH (29, 30). En este proyecto se estudiará la capacidad de

movilización de una isla de patogenicidad posiblemente adquirida por transferencia lateral en la bacteria *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Salmonella enterica es un enteropatógeno intracelular facultativo que afecta a un amplio rango de hospederos y que cuenta con más de 2.500 serovares, de los cuales el serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y Enteritidis (*S. Enteritidis*) han sido ampliamente estudiados, debido a su impacto en la salud humana y en animales de importancia comercial. Esta bacteria logra invadir células epiteliales del intestino, preferencialmente células M ubicadas en las Placas de Peyer, y sobrevivir en macrófagos gracias a los Sistemas de Secreción Tipo III (SSTT) codificados en la isla de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2). Una vez que *S. Typhimurium* alcanza la lámina propia del epitelio intestinal, se disemina a órganos como el bazo e hígado, para generar infección sistémica (31).

Gracias a la secuenciación de genomas de varios serovares de *Salmonella enterica* y a su disponibilidad en bases de datos públicas, se han realizado estudios de genómica comparativa a partir de los cuales se ha logrado identificar regiones adquiridas a través de TGH, como la isla de patogenicidad ROD21 en el cromosoma de *S. Enteritidis*, que se describe a continuación.

1.5 La isla de patogenicidad ROD21

ROD21 (*Region of Difference 21*) es una isla genómica de 26,5 kb, ubicada entre las coordenadas 2,061,170 y 2,087,657 del genoma de la cepa PT4 NCTC13349 de *S. Enteritidis*. Esta isla se encuentra además en el genoma de *S. Gallinarum* y *S. Dublin* (32).

Esta región genómica presenta características típicas de islas de patogenicidad (Fig. 1-1): 1) se encuentra inserta en una región donde existen 3 copias del gen que codifica el tRNA de asparragina (*asnT*) en el genoma de *S. Enteritidis*, 2) en su extremo 5' tiene un gen que codifica una integrasa similar a las presentes en los fagos de la familia P4, 3) está delimitada por secuencias directas repetidas de 22 pb, que son idénticas a los últimos 24 pb del gen *asnT*, y 4) su porcentaje de G+C es de 37,5%, mientras que el resto del genoma es de un 52,2%. ROD21 es considerada una isla de patogenicidad, debido a que codifica a la proteína TlpA (TIR-like protein A), involucrada en la virulencia de la bacteria, modulando los mecanismos de defensa del hospedero que determinan la regulación de NF- κ B y activación de caspasa-1 (33).

En estudios previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que ROD21 es una isla de patogenicidad inestable, pues realiza un proceso de escisión mediante recombinación sitio-específica que es catalizado posiblemente por la integrasa que está codificada dentro de la isla. Esta enzima reconocería las secuencias directas repetidas que flanquean la isla de patogenicidad (34), produciendo un intermediario circular que puede permanecer como elemento episomal dentro de la bacteria o segregarse y perderse. En el caso de ROD21, hemos determinado que la escisión puede ocurrir por 4 eventos de recombinación diferentes, que se detallan en la Figura 1-1.

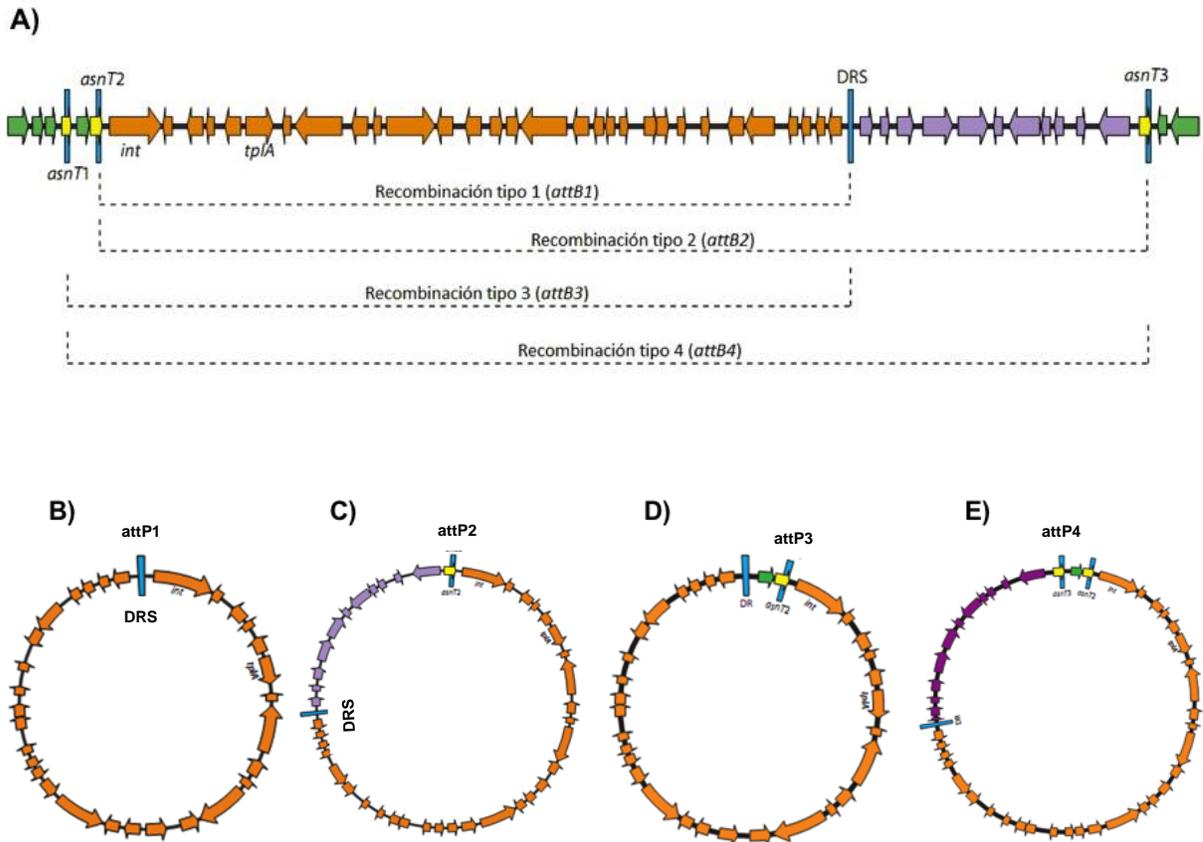


Figura 1-1. Esquema de la isla de patogenicidad ROD21 presente en el cromosoma de *Salmonella* Enteritidis. A) Se indica la ubicación del gen que codifica la integrasa (*int*), el factor de virulencia TlpA, las copias de *asnT* y las secuencias directas repetidas (DRS), además de los 4 posibles tipos de recombinación que generan la escisión de la isla (*attB1-4*) y sus respectivos elementos episomales (*attP*): *attP1* (**B**), *attP2* (**C**), *attP3* (**D**) y *attP4* (**E**).

La importancia de la inestabilidad de regiones que contienen factores de virulencia está dada por la posible transferencia del elemento genético y la función que jugaría la pérdida de la isla de patogenicidad durante la transición de fase aguda a crónica durante un proceso infeccioso (35, 36). Hemos detectado esta inestabilidad durante el crecimiento de *S. Enteritidis* en medio de cultivo e intracelularmente durante la infección de células fagocíticas (37). Además, logramos detectar cuatro tipos de escisión para esta isla de patogenicidad (Fig. 1-1), formando a su vez cuatro

tipos de intermediarios circulares. También hemos demostrado eventos de pérdida espontánea de la isla en condiciones *in vitro*, que resultan en la generación de bacterias que carecen de ROD21 (37). Por otro lado, mediante análisis bioinformáticos hemos identificado marcos de lectura presentes en esta isla de patogenicidad que tienen identidad con proteínas involucradas en la maquinaria conjugativa de movilización de ADN, como MobA y TraD.

Según los antecedentes mencionados anteriormente, el objetivo de esta tesis fue determinar si esta isla de patogenicidad inestable es transferible a bacterias receptoras en condiciones de cultivo *in vitro*, además de determinar la frecuencia de la ocurrencia de este fenómeno y el mecanismo por el cual ocurre. Por último, esta tesis tuvo como objetivo identificar condiciones ambientales que podrían favorecer el traspaso de esta isla de patogenicidad a otras bacterias.

HIPÓTESIS

La isla de patogenicidad ROD21 presente en el cromosoma de *S. Enteritidis* es un elemento genético inestable capaz de transferirse a bacterias que carecen de ella mediante un proceso de TGH que es alterado por condiciones ambientales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la ocurrencia de la transferencia horizontal de la isla de patogenicidad ROD21 presente en el cromosoma de *S. Enteritidis* en condiciones de laboratorio y frente a diferentes condiciones ambientales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la ocurrencia y frecuencia de transferencia genética horizontal de ROD21 en condiciones *in vitro* hacia *S. Enteritidis* y otras bacterias filogenéticamente cercanas.
2. Determinar el mecanismo por el cual ocurre TGH de ROD21 en condiciones *in vitro* hacia otras bacterias.
3. Determinar el efecto de pH, temperatura y estrés oxidativo en la frecuencia de transferencia de ROD21 hacia otras bacterias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Cepas y plásmidos

Las cepas de *Salmonella* utilizada en este estudio fueron *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT1 (*S. Enteritidis*), donada por la Sra. Alda Fernández del Instituto de Salud Pública de Chile; *S. Enteritidis* PT4 NCTC13349, donada por el Dr. Carlos Santiviago de la Universidad de Chile, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) 14028s, donada por el Dr. Guido Mora de la Universidad Andrés Bello y *S. Typhimurium* 14028s pSLT⁻ donada por el Dr. Josep Casadesús de la Universidad de Sevilla, España.

Las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizadas fueron *E. coli* H10407 y *E. coli* EDL933, ambas donadas por el Dr. Roberto Vidal de la Universidad de Chile.

Los plásmidos pKD3, pKD4 y pKD46 fueron obtenidos desde el *E. coli* Genetic Resources at Yale CGSC, The Coli Genetic Stock Center. El plásmido pCLF1 fue donado por el Dr. Carlos Santiviago.

La descripción de cepas y plásmidos se encuentra detallada en la Tabla 2.1.

2.1.2 Biología Molecular

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) se utilizó: SDS, TRISbase, EDTA, Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Winkler), Proteinasa K y RNasa (US Biological), Etanol e Isopropanol (Merck). Los reactivos de PCR convencional utilizados fueron: Taq DNA polimerasa, tampones de reacción, MgCl₂ y dNTPs

(Invitrogen), las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Axygen Maxygene Gradient Thermal Cyclor.

Para la extracción plasmidial se utilizó el kit de extracción Wizard Plus SV Miniprep de Promega. Para la resolución de los productos de PCR y ADN plasmidial se utilizó agarosa grado Biología Molecular (Lafken) y como marcador de peso molecular de ADN se usó estándar de 1 kb de Fermentas, además de cámara de geles BioRad, fuente de poder BioRad PowerPac Basic y transiluminador UV UVP inc TM-36.

Para realizar transformaciones bacterianas se utilizaron cubetas de electroporación (Invitrogen), solución de glicerol 10% (Winkler) y filtros para microdiálisis de ADN de 0,025µm tamaño de poro (Millipore).

Tabla 2.1. Descripción de cepas, plásmidos y fagos utilizados.

Cepas	Genotipo relevante	Referencia
<i>Salmonella enterica</i>		
S. Enteritidis PT4	Cepa de referencia NCTC 13349	(32)
S. Enteritidis PT1	Aislado clínico, cepa <i>wild type</i>	(37)
S. Enteritidis PT1 ROD21:: <i>aph</i>	Cepa de S. Enteritidis marcada con el gen <i>aph</i> entre los ORF SEN1975-SEN1976	Este trabajo
S. Enteritidis PT1 ΔROD21 <i>putA::cat</i>	Cepa de S. Enteritidis que ha perdido ROD21 de forma espontánea y que ha sido marcada con el gen <i>cat</i> río abajo del gen <i>putA</i>	Este trabajo
S. Enteritidis PT1 pBAD-SEN1998	Cepa de S. Enteritidis con plásmido pBAD-SEN1998	(38)
S. Enteritidis PT1 ROD21:: <i>aph</i> pBAD-SEN1998	Cepa de S. Enteritidis con gen <i>aph</i> entre los ORF SEN1975-SEN1976 y con plásmido pBAD-SEN1998	Este trabajo
S. Typhimurium 14028s	Cepa de referencia ATCC, <i>wild type</i>	(39)
S. Typhimurium 14028s <i>putA::cat</i>	Cepa de S. Typhimurium marcada con el gen <i>cat</i> río abajo del gen <i>putA</i>	Este trabajo
S. Typhimurium 14028s pSLT ⁻	Cepa de S. Typhimurium que carece del plásmido de virulencia pSLT	(40)

<i>Escherichia coli</i>		
H10407	Aislado clínico patotipo ETEC, cepa <i>wild type</i>	(41)
H10407 <i>putA::cat</i>	Cepa de <i>E. coli</i> marcada con el gen <i>cat</i> río abajo del gen <i>putA</i>	Este trabajo
EDL933	Aislado clínico patotipo EHEC, cepa <i>wild type</i>	(42)
EDL933 <i>putA::cat</i>	Cepa de <i>E. coli</i> marcada con el gen <i>cat</i> río abajo del gen <i>putA</i>	Este trabajo
Plásmidos	Genotipo relevante	Referencia
pKD3	Contiene el gen <i>cat</i> flanqueado por secuencias FRT	(43)
pKD4	Contiene el gen <i>aph</i> flanqueado por secuencias FRT	(43)
pCLF1	Contiene el gen <i>dhfr</i> flanqueado por secuencias FRT	GenBank: HM047090.1
pKD46	Contiene el gen de la recombinasa del fago Lambda	(43)
Fagos	Origen, característica relevante	Referencia
P22 HT105/1 <i>int-201</i>	Derivado del fago P22, con alta frecuencia de transducción	(44)
P22H5	Derivado lítico del fago P22, mutante para la proteína c2	(44)

2.2 Métodos

2.2.1 Condiciones de cultivo

Todas las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C en un agitador orbital a 130 rpm (Lab-line environ shaker) hasta alcanzar fase estacionaria, entre 15 y 17 h.

2.2.2 Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio de cultivo líquido y sólido Luria Bertani (LB), el que fue preparado de acuerdo a las instrucciones del proveedor (MO BIO). Para seleccionar bacterias dadoras, receptoras y transconjugantes, se utilizó medio LB sólido o líquido suplementado con kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL) y con ambos antibióticos a la vez, respectivamente, preparados según las indicaciones del proveedor (Calbiochem).

2.2.3 Inserción de genes de resistencia mediante doble recombinación homóloga

Para generar la cepa dadora resistente a kanamicina y las distintas cepas receptoras, resistentes a cloranfenicol o trimetoprim, se utilizó la técnica descrita por Datsenko y Wanner (43). Mediante PCR se amplificó el gen de resistencia con los partidores detallados en la Tabla 2.3, desde los plásmidos pKD3 (gen *cat*), pKD4 (gen *aph*) o pCLF1 (gen *dhfr*). Paralelamente, se transformó mediante electroporación la cepa *S. Enteritidis* PT4, *E. coli* H10407, *E. coli* EDL933 o *S. Typhimurium*, según corresponda, con el plásmido pKD46. Luego, se

electroporaron los productos de PCR, de forma independiente, en cepas transformadas con el plásmido pKD46.

Finalmente, las bacterias fueron cultivadas en agitación, por 3 h a 37°C en 2 mL de medio LB y sembradas en medio agar LB, suplementado con kanamicina (50 µg/ml), cloranfenicol (10 µg/mL) o trimetoprim (20 µg/mL), según corresponda. Para verificar la inserción del gen, se realizó amplificación mediante PCR con partidores que hibridan en regiones externas al inserto y al interior de este, resultando una reacción positiva sólo si el gen se encuentra en la posición correcta.

2.2.4 Transducción de genes de resistencia a cepas de *S. Enteritidis* PT1

Las inserciones cromosomales de genes que confieren resistencia a antibióticos para cepas de *S. Enteritidis* se realizaron en la cepa de referencia NCTC 13349 (PT4) y posteriormente se traspasó el gen a la cepa PT1 mediante transducción generalizada con el uso del fago P22 HT105/1 *int-201*, debido a que esta cepa corresponde a un aislado clínico y no fue posible realizar inserciones cromosomales directamente. Para realizar el lisado, se creció la cepa PT4 marcada en 10 mL junto con 100 µL del fago P22 hasta OD₆₀₀=0,6. Posteriormente, se centrifugó el cultivo por 5 min a 15.000 rpm (HITACHI CT15RE), se recuperó el sobrenadante y se filtró en filtro 0,2 µm de tamaño de poro, se agregó 200 µL de cloroformo y se almacenó a 4°C. Se creció cultivos de la cepa PT1, receptora de la marca, en 2 mL de medio LB líquido en agitación a 37°C, se tomó 100 µL del cultivo y se mezcló con 30 µL del lisado obtenido anteriormente, se incubó por 10 min a 37°C y se agregó 900 µL de medio LB, luego se incubó por 15 min a 37°C y se sembró 100 µL en el antibiótico correspondiente. Se verificó que las colonias

obtenidas no fueran pseudolisógenas mediante infección con el fago P22H5. Las colonias sensibles al fago P22H5 fueron analizadas mediante PCR para comprobar la correcta inserción de los genes transducidos (Protocolo modificado de (45)).

2.2.5 Transferencia de ROD21 en medio líquido

En estos experimentos, la cepa dadora y las distintas receptoras fueron crecidas en sus respectivos antibióticos, hasta fase estacionaria en medio LB y lavadas dos veces con PBS (NaCl 0,14 M, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 7,81 mM, KCl 2,68 mM). Posteriormente, a 4,5 mL de medio LB líquido se agregó 150 µL del cultivo que contenía la cepa dadora y 450 µL del cultivo que contenía la cepa receptora y se incubó a 37°C por 4h. Finalmente, se realizó recuento de dadoras, mediante diluciones seriadas a partir de la mezcla de cultivos hasta la dilución 1/1.000.000, de la cual se sembraron alícuotas de 100µL en agar LB suplementado con kanamicina (50µg/mL) y de transconjugantes (siembra directa), sembradas en kanamicina (50 µg/mL) más cloranfenicol (10 µg/mL) o kanamicina (50 µg/mL) más trimetoprim (20 µg/mL), según corresponda. La frecuencia de transferencia es calculada dividiendo el número de transconjugantes por mL por el número de dadoras viables en la mezcla al final de las 4 h de incubación. Los recuentos de colonias son realizados con un contador digital (Stuart Scientific – Inglaterra).

2.2.6 Tratamientos con H₂O₂, temperatura y pH

Se utilizó la metodología descrita en el punto 2.2.5 para ensayos de transferencia en medio líquido y se realizó distintos tratamientos de incubación. Para determinar el efecto del estrés oxidativo en la transferencia de ROD21, se utilizó una

concentración final de 0,25 mM de H₂O₂ (10 veces bajo la concentración mínima inhibitoria). Para analizar el efecto de la temperatura, se incubó a 23°C y 43°C y, finalmente, para evaluar el efecto del pH, se utilizó LB ajustado a pH = 5, ya que a valores menores de pH no se obtuvo crecimiento bacteriano.

2.2.7 Transferencia de ROD21 en filtro

Para determinar si la transferencia de ROD21 ocurre mediante conjugación, se realizaron ensayos de transferencia en filtro, como se describió anteriormente (45). La cepa dadora y las distintas receptoras son cultivadas en sus respectivos antibióticos hasta fase estacionaria en medio LB y lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, se mezclaron 0,6 mL de la cepa dadora y 1,8 mL de la cepa receptora y se pasaron a través de un filtro de 0,2 µL de tamaño de poro (Millipore), el cual es incubado por 4 h a 37°C en agar LB. Finalmente, se recuperaron las bacterias desde el filtro y de la superficie del agar LB y se realizó recuento de dadoras y transconjugantes, del mismo modo que el punto 2.2.5.

2.2.8 Transferencia de ROD21 mediante transformación natural, utilizando concentraciones conocidas de ADN

Para determinar si existe transferencia de ROD21 mediante transformación natural, se realizó purificación de ADN genómico total de la bacteria dadora, según lo descrito en el punto 2.2.10, se realizó incubaciones de las bacterias receptoras con 1ng, 10ng, 100ng o 1µg de ADN de la bacteria dadora y se realizaron ensayos de transferencia en medio líquido, co-incubando las distintas concentraciones de ADN

con las distintas cepas receptoras en ensayos independientes. Finalmente, se realizó recuentos de dadoras y transconjugantes según se detalla en el punto 2.2.5.

2.2.9 Determinación de la transferencia de ROD21 mediante transducción

Para determinar si hay transferencia de ROD21 mediante un proceso de transducción a partir de fagos presentes en el sobrenadante de la cepa dadora, se filtró la cepa dadora crecida en fase estacionaria en un filtro de 0,2 μm , se agregó cloroformo para eliminar las bacterias residuales y 10 unidades de RQ1 DNase (Promega). 150 μL de este sobrenadante así tratado es incubado con las distintas cepas receptoras, en ensayos independientes, como se describe en el punto 2.2.5.

2.2.10 Extracción de ADN de bacterias

Para la extracción de ADN genómico (ADNg), se centrifugaron los cultivos bacterianos a 6.000 rpm por 5 min. El pellet obtenido es resuspendido en 570 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Se agregó 10 μL de Proteinasa K (10 mg/mL), 5 μL de RNasa (10 mg/mL) y 30 μL de SDS al 10 %. La mezcla se agitó y se incubó por 1h a 37°C. Luego, se agregó un volumen de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó por inversión y se centrifugó por 5 min a 15.000 rpm. Se rescató la fase acuosa (superior) en un tubo limpio y se repitió la extracción fenólica hasta obtener una fase acuosa transparente. Posteriormente, se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M, la mezcla se agitó por inversión y se dejó precipitando el ADN

por 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 10 min a 15.000 rpm y se eliminó el sobrenadante por aspiración. El sedimento se lavó con 200 μ L de etanol frío al 70 %, se centrifugó por 10 min a 15.000 rpm, se eliminó el sobrenadante por aspiración y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspendió en un volumen de 50 μ L de agua libre de nucleasas (Invitrogen) y se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso.

Para la extracción de ADN plasmidial, se utilizó el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification de Promega, según las instrucciones del fabricante.

2.2.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se realizaron utilizando la siguiente mezcla de reacción: Buffer 1X PCR, 1 pmol/ μ L de cada partidor; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 1,5 mM MgCl₂; 0,25 unidades/ μ L de *Taq* polimerasa y \geq 1 ng/ μ L de ADN. El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 2.2 y los partidores utilizados se indican en la Tabla 2.3.

Tabla 2.2. Programa de PCR utilizado.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
Desnaturación inicial	95	10 min	1
Desnaturación	95	40 s	
Alineamiento	56-65	40 s	35
Elongación	72	1-2,5 min	
Elongación final	72	10 min	1

Se realizaron variaciones según la temperatura de alineamiento de cada partidor y el tiempo de elongación según el tamaño del amplificado.

Tabla 2.3. Partidores y sondas utilizados para verificar genotipo y realizar inserción de genes. *La pareja de partidores *putAP* Fw-Rev se utilizó para amplificar la región de inserción del gen *cat* en *E. coli* (Ec), *S. Typhimurium* (STm) y *S. Enteritidis* (SEn). Se indica el tamaño esperado para la región sin inserto (-) y con inserto (+). **Los primeros 40 pb de estos partidores hibridan en el cromosoma de la bacteria y los 20 últimos (en negrita) hibridan en los plásmidos pKD3 y pKD4, desde donde se amplificó la secuencia de los genes *cat* y *aph*, respectivamente.

Nombre del <i>partidor</i>	Secuencia	Tamaño amplícón (pb)
SEN 1968 Fw	GACGGAAATCTTTTCGCCTG	1011
SEN 1970 (integrarse) Rev	CGGCGTAATCTTCTGACCAT	
SEN 1999 Fw	CAGCAAGACCCTGCCAGAGT	914
SEN 2001 Rev	AGTGGGCTTATTGGGATCGG	
SEN <i>yeeO</i> Fw	TCATAATCACCAGCGACTGG	903
SEN 2013 Rev	CGCTCCAGCACCTCATTAAC	
		1044 Ec-
<i>putAP</i> Fw*	ATGTGACCTGCGTTGCAAGC	1958 Ec+
		1030 STm-
		1838 STm+
<i>putAP</i> Rev*	GCCCCTTGAGCATGTGCGACA	1030 SEn-
		1943 SEn+
SEN1975 Fw	TTCTGATGAGCAGCGTAAAGAGGC	1099 SEn-
SEN1976 Rev	TGGTGGTGGAAAGAATGATCACTT	2469 SEn+
LepA Gifsy-1 Fw	GCCCAGGTAGTTATCGAACCAGGA	1110
GogB Gifsy-1 Rev	GGTTTGATGTGCGCCTCGTTACT	
Partidores utilizados para insertar genes en el cromosoma bacteriano		
<i>putAP</i> ::Cm (H1+P1)**	AAATTGTTAAAAAAGAAAGAGGGAGTCTGAC GGG GAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1094
<i>putAP</i> ::Cm (H2+P2)**	TCACAATCGATTTAACACACCATTTACATCAAATTTG ATTCCATATGAATATCCTCCTT	

EHEC-ETEC <i>putAP</i> ::Cm	TGTTAATAAAAAGAAATCGATATGACAGGGATTA AAAA	
(H1+P1)**	AAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1086
EHEC-ETEC <i>putAP</i> ::Cm	ATTCACAATCGATTTAACACACCATTTACATTAAATT	
(H2+P2)**	TTACCATATGAATATCCTCCTTA	
ROD21::kan (H1+P1)**	GGAACTCTCCATTGGAGAGAATACATATCACTTGG	
	GAAAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1558
ROD21::kan (H2+P2)**	ATGTTTGTGTTTAAACATTATAATAAAATTTAACTTTT	
	AACCATATGAATATCCTCCTTA	
STM 14028 <i>putAP</i> ::Cm	AAAAGGTGCAACCGCAAAAAATGTGAGAGAGTGCA	
(H1+P1)**	ACCTGAACTTCATTTAAATGGCGCG	968
STM 14028 <i>putAP</i> ::Cm	CGTGGCAAGGGTGTTATGTTTACCAGGGCGACCGT	
(H2+P2)**	ATCCTGGCGCGCCTACCTGTGACGG	
SEN 1970 (H1+P1)**	ATGCTGGTAAAGCTGGTTCGATTTGTGTTTTACCAG	
	CACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1557
asnT – SEN 1970	TTGTTTCTGAGCAAACCTCAAACGGCCTGACCATCTC	
(H2+P2)**	ATACCATATGAATATCCTCCTTA	
STM_phoN_tmtp	CAGACCGGTTTTACCGCTTCAGCCGGACAACGACG	
(H1+P1)**	TCATGTCAAGATCCCCTCACGCTGC	1247
STM_phoN_tmtp	GCGGCCGGGCGTGAGAAATGCCTTTGGTTTCCCC	
(H2+P2)**	GATTCGAGAGCGCTTTTGAAGCTGGG	
Partidores y sondas para detectar <i>attB</i>		
attB1-nested-RT-Fw	GTTACTATGCGCCCCGTTACAC	-
attB1-nested-RT-Rev	CCGATTAAGCCCCAAAACTATG	-
rpoD-RT-Fw	GTTGACCCGGGAAGGCGAAA	221
rpoD-RT-Rev	CAGAACCGACGTGAGTTGCG	-
attB-1 probe	TTCGAGTCCAGTCAGAGGA	-
rpoD probe	CGACATCGCTAACG	-

2.2.12 Ensayos de virulencia en ratones infectados con *Salmonella*

Para evaluar la virulencia de la cepa *S. Typhimurium* que adquirió ROD21, en comparación a la cepa *wild type*, se infectaron grupos de 4 ratones machos C57BL/6 (5-6 semanas de edad). Se crecieron las bacterias en medio LB a 37°C hasta alcanzar $OD_{600} = 0,6$ y se centrifugó el volumen de cultivo bacteriano que contenía 1×10^5 UFC a $10.000 \times g$ durante 5 minutos. El pellet bacteriano se resuspendió en 200 μ l de PBS y se utilizó para infectar ratones intragástricamente. Se realizaron diluciones seriadas del inóculo bacteriano para corroborar la dosis infectiva. Después de la infección, la tasa de supervivencia se registró diariamente.

2.2.13 Análisis estadísticos

Para todos los ensayos se realizaron 3 muestras independientes ($n = 3$). Los resultados obtenidos fueron comparados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) o prueba t de Student, según corresponda, utilizando un nivel de significancia de $p < 0,005$.

3 RESULTADOS

3.1 Generación de una cepa de *S. Enteritidis* dadora de ROD21

Para determinar si ROD21 es capaz de transferirse a bacterias receptoras, se generó una cepa dadora de la isla de patogenicidad mediante la inserción del gen *aph* en una región interna de la isla de patogenicidad, específicamente entre los ORF SEN1975 y SEN1976. El gen *aph* codifica la enzima aminoglicósido fosfotransferasa y otorga a la bacteria resistencia a kanamicina. Esto fue realizado mediante inserción cromosomal, como se detalla en el punto 2.2.3., en una primera instancia en la cepa *S. Enteritidis* PT4, para luego transducir la marca a la cepa *S. Enteritidis* PT1. Mediante esta metodología se obtuvo exitosamente la cepa *S. Enteritidis* PT1 ROD21::*aph* (Figura 3-1). Al utilizar partidores que hibridan en regiones externas e internas del inserto, según se muestra en el esquema de la Figura 3-1 A, se obtienen productos de PCR específicos que indican que la inserción del gen *aph* ha sido correcta (Figura 3-1 C). Lo contrario ocurre al comparar con la cepa *wild type* (Figura 3-1 B), donde se obtiene reacción positiva sólo cuando se utilizan los partidores SEN1975 Fw y SEN1976 Rev, en el carril 1, pero de menor tamaño que la cepa generada (Figuras 3-1 B y 3-1 C).

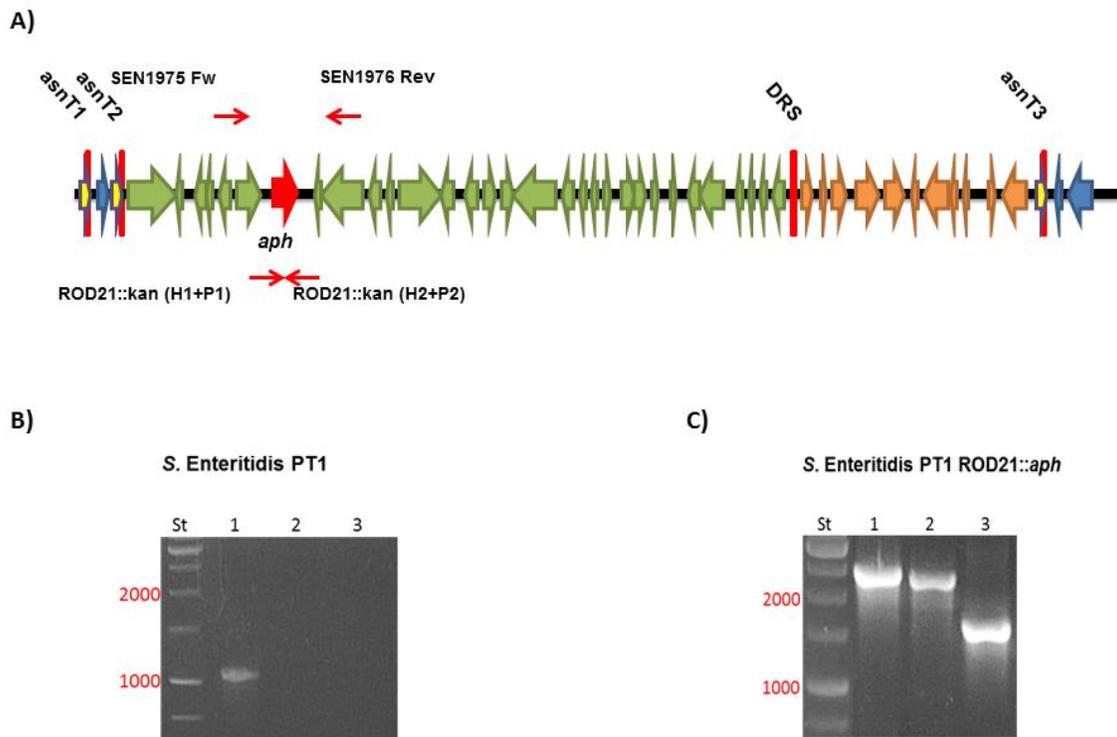


Figura 3-1. Obtención de la cepa dadora *S. Enteritidis* PT1 ROD21::*aph*. A) Esquema de la región de inserción del gen *aph* entre los ORF SEN1975 y SEN1976 de ROD21 y la ubicación de los partidores utilizados para verificar la inserción del gen. Se muestran los geles de agarosa donde se resuelven los productos de PCR para verificar el genotipo de la cepa *S. Enteritidis* PT1 *wild type* (B) en comparación a la cepa generada *S. Enteritidis* PT1 ROD21::*aph* (C). St: Estándar de peso molecular 1 kb, 1: Amplificación con partidores que hibridan en regiones externas y que flanquean la región de inserción (SEN 1975 Fw – SEN 1976 Rev). Amplicones de 1.099 pb para la cepa *wild type* y 2.469 pb para cepa marcada. 2: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (SEN1975 Fw - ROD21::kan (H2+P2)). Amplicón de 2.388 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*. 3: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (ROD21::kan (H1+P1) - SEN1976Rev). Amplicón de 1.638 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*.

3.2 Generación de una cepa de *S. Enteritidis* receptora de ROD21

En el laboratorio se generó una cepa de *S. Enteritidis* que perdió espontáneamente ROD21 mediante escisión por recombinación de *asnT-2* y *asnT-3* (Figura 1-1) (37). Esta cepa se convierte en receptora de la isla, por lo que se le agregó un marcador de selección río abajo del gen *putA*, ya que se ha descrito anteriormente en *Salmonella* que no afecta la virulencia de la bacteria (46). Este marcador es el gen *cat*, que codifica la enzima cloranfenicol acetiltransferasa y que otorga resistencia a cloranfenicol. Esto se realizó mediante inserción cromosomal por doble recombinación homóloga, según está descrito en el punto 2.2.3. Mediante esta metodología, se obtuvo exitosamente la cepa *S. Enteritidis* PT1 Δ ROD21 *putA::cat* (Figura 3-2). Al utilizar partidores que hibridan en regiones externas e internas del inserto, según se muestra en el esquema de la Figura 3-2 A, se obtienen productos de PCR específicos que indican que la inserción del gen *cat* ha sido correcta (Figura 3-2 C), lo contrario ocurre al comparar con la cepa *wild type* (Figura 3-2 B), donde se obtiene reacción positiva sólo cuando se utilizan los partidores *putAP Fw* y *putAP Rev*, en el carril 1, pero de menor tamaño que la cepa *putA::cat* generada (Figuras 3-2 B y 3-2 C).

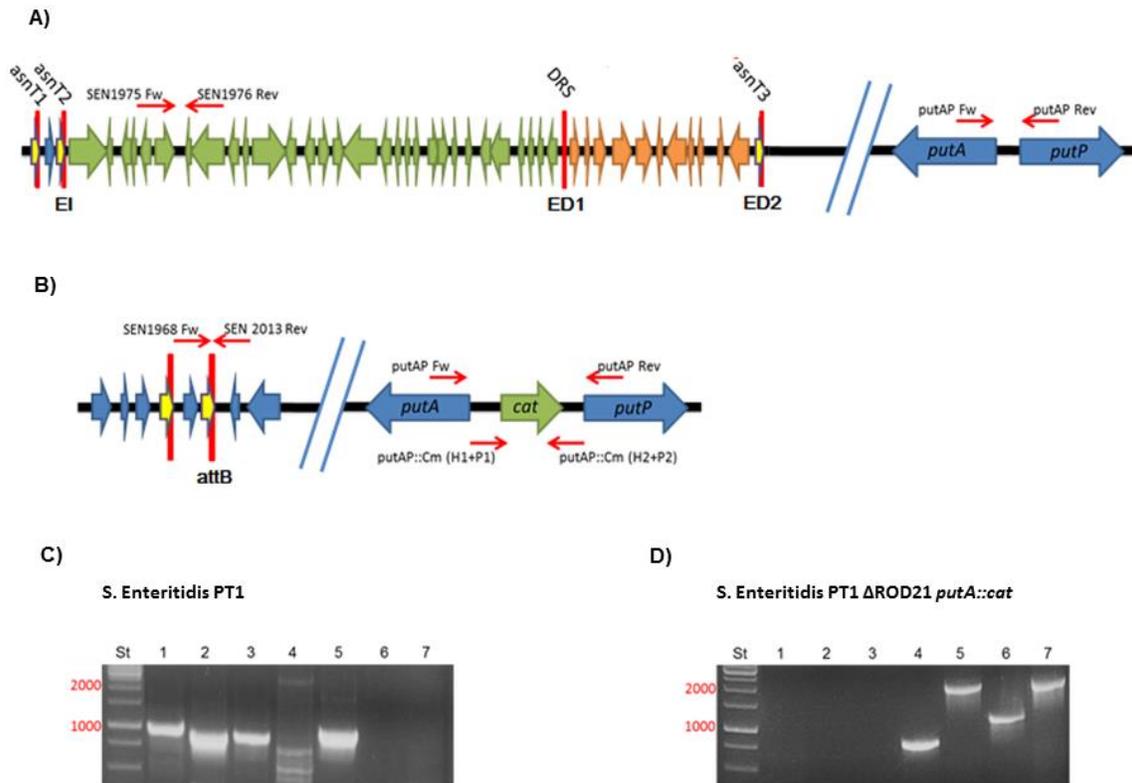


Figura 3-2. Generación de cepa receptora *S. Enteritidis* PT1 Δ ROD21 *putA::cat*. **A)** Esquema de la cepa *S. Enteritidis* PT4 mostrando ROD21 (Extremo Izquierdo (EI), Extremo Derecho 1 (ED1) y Extremo Derecho 2 (ED2)) y la región de ubicación de los genes *putA* y *putP*. **B)** Esquema de la región de inserción del gen *cat*, entre los genes *putA* y *putP* y la ubicación de los partidores utilizados para verificar la inserción del gen. Se muestran los geles de agarosa donde se resuelven los productos de PCR para verificar el genotipo de la cepa *S. Enteritidis* PT1 *wild type* (**C**) en comparación a la cepa *S. Enteritidis* PT1 Δ ROD21 *putA::cat* (**D**). St: Estándar de peso molecular 1 kb, 1: Amplificación de E1 de ROD21 (SEN1968 Fw – SEN 1970 (integrase) Rev). Amplicón de 762 pb para cepa *wild type* y sin producto para cepa receptora. 2: Amplificación de ED1 de ROD21 (SEN1999 Fw – SEN2001 Rev). Amplicón de 914 pb para cepa *wild type* y sin producto para cepa receptora. 3: Amplificación de ED2 de ROD21 (SEN yeeO Fw – SEN2013 Rev). Amplicón de 903 pb para cepa *wild type* y sin producto para cepa receptora. 4: Amplificación de secuencia de escisión (*attB*) de ROD21 (SEN1968 Fw – SEN2013 Rev). Amplicón de 762 pb para cepa receptora y sin producto para cepa Wt. 5: Amplificación con partidores que hibridan en regiones externas y flanquean la región de inserción del gen *cat* (*putAP* Fw – *putAP* Rev). Amplicones de 1.014 pb para cepa *wild type* y 1.940 pb para cepa marcada. 6: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (*putAP* Fw - *putAP::Cm* (H2+P2)). Amplicón de 1.126 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*. 7: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (*putAP::Cm* (H1+P1) – *putAP* Rev). Amplicón de 1.911 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*.

3.3 Generación de una cepa de *S. Typhimurium* receptora de ROD21

ROD21 es una isla de patogenicidad presente en diversos serovares de *S. enterica*, como Enteritidis, Dublin y Gallinarum, por lo tanto, otros serovares también podrían ser receptores de esta isla. Dado que la organización genética de los genes que codifican tRNA de asparragina (*asnT*-tRNA) en el genoma del serovar Typhimurium es idéntica a la de *S. Enteritidis* y sus secuencias nucleotídicas comparten 100% de identidad (Figura 3-4), se evaluó la posibilidad que ROD21 sea transferida desde *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium*. Para abordar este objetivo, se insertó el gen *cat* entre los genes *putA* y *putP* en el genoma de *S. Typhimurium* 14028s, tal como se detalla en la sección 2.2.3. Se obtuvo de esta forma la cepa *S. Typhimurium putA::cat* (Figura 3-3). Al utilizar partidores que hibridan en regiones externas e internas del inserto, según se muestra en el esquema de la Figura 3-3 A, se obtienen productos de PCR específicos que indican que la inserción del gen *cat* ha sido correcta (Figura 3-3 B). Lo contrario ocurre al comparar con la cepa *wild type* (Figura 3-3 C), donde se obtiene reacción positiva sólo cuando se utilizan los partidores *putAP* Fw y *putAP* Rev, en el carril 1, pero de menor tamaño que la cepa generada (Figuras 3-3 B y 3-3 C).

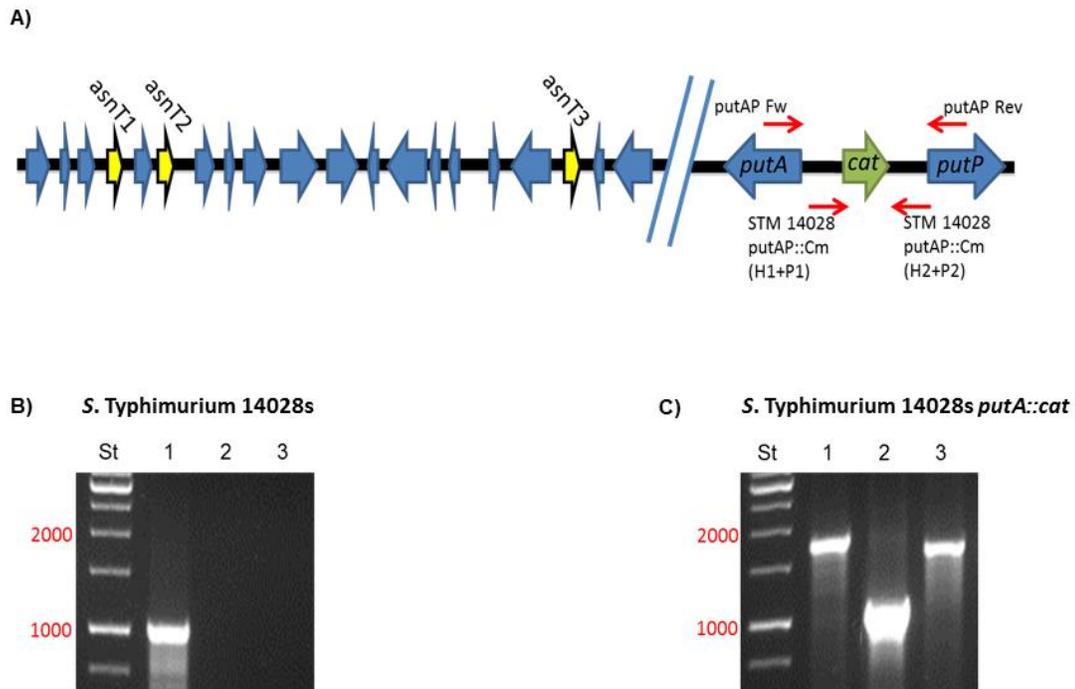


Figura 3-3. Generación de cepa receptora *S. Typhimurium* 14028s *putA::cat*. A) Esquema de la organización génica de los *asnT*-tRNA en *S. Typhimurium*, la región de inserción del gen *cat* río abajo del gen *putA* y la ubicación de los partidores utilizados para verificar la inserción del gen. Se muestran los geles de agarosa donde se resuelven los productos de PCR para verificar el genotipo de la cepa *S. Typhimurium* 14028s *wild type* (B) en comparación a la cepa *S. Typhimurium* 14028s *putA::cat* generada (C). St: Estándar de peso molecular 1 kb, 1: Amplificación con partidores que hibridan en regiones externas y flanquean la región de inserción (*putAP fw* – *putAP Rev*). Amplicones de 1.030 pb para cepa *wild type* y 1.838 pb para cepa marcada. 2: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (*putAP Fw* - STM 14028 *putAP::Cm* (H2+P2)). Amplicón de 1.079 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*. 3: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (STM 14028 *putAP::Cm* (H1+P1) – *putAP Rev*). Amplicón de 1.727 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*.

3.4 Generación de cepas de *E. coli* receptoras de ROD21

La organización génica de los genes que codifican *asnT*-tRNA en las cepas *E. coli* H10407 y *E. coli* EDL933 es similar a la que posee *S. Enteritidis* y la secuencia nucleotídica de estos son 100% idénticos (Figura 3-4). Además de lo anterior, la cercanía filogenética que tienen estas bacterias hace suponer que *E. coli* H10407 y *E. coli* EDL933 podrían ser receptoras de ROD21. Para determinar si estas cepas de *E. coli* podrían ser receptoras naturales de la isla de patogenicidad, se insertó el gen *cat* río abajo del gen *putA*, de la forma descrita en el punto 2.2.3, en el cromosoma de las cepas de *E. coli*. Finalmente, se obtuvieron las cepas *E. coli* H10407 *putA::cat* (Figura 3-5) y *E. coli* EDL933 *putA::cat* (Figura 3-6). Al utilizar partidores que hibridan en regiones externas e internas del inserto, según se muestra en esquemas de las Figuras 3-5 A y 3-6 A, se obtienen productos de PCR específicos que indican que la inserción del gen *cat* ha sido correcta (Figura 3-5 C y 3-6 C). Lo contrario ocurre al comparar con la cepa *wild type* (Figura 3-5 B y 3-6 B), donde se obtiene reacción positiva sólo cuando se utilizan los partidores *putAP* Fw y *putAP* Rev, en el carril 1, pero de menor tamaño que la cepa generada (Figuras 3-5 B y C y 3-6 B y C).

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	76	
<i>S. Enteritidis</i> <i>asnT</i> -tRNA	(1)	TCCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTGTTAATCCGTATGTCACCTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGGAGCCA								
<i>S. Typhimurium</i> <i>asnT</i> -tRNA	(1)	TCCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTGTTAATCCGTATGTCACCTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGGAGCCA								
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>asnT</i> -tRNA	(1)	TCCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTGTTAATCCGTATGTCACCTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGGAGCCA								
<i>E. coli</i> H10407 <i>asnT</i> -tRNA	(1)	TCCTCTGTAGTTCAGTCGGTAGAACGGCGGACTGTTAATCCGTATGTCACCTGGTTCGAGTCCAGTCAGAGGAGCCA								

Figura 3-4: Secuencias nucleotídicas de *asnT*-tRNA de *S. Enteritidis* PT4, *S. Typhimurium* 14028s, *E. coli* EDL933 y *E. coli* H10407. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los *asnT*-tRNA de la cepa dadora y las distintas cepas receptoras.

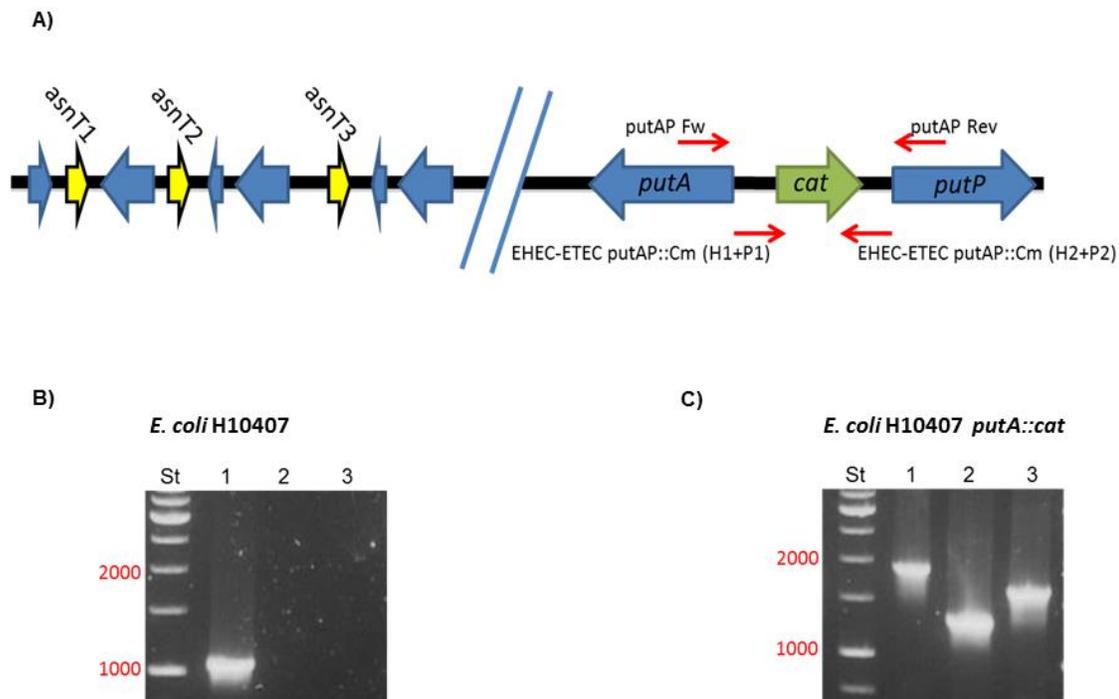


Figura 3-5. Generación de cepa receptora *E. coli* H10407 *putA::cat*. A) Esquema de la organización génica de los *asnT*-tRNA en *E. coli* H10407, la región de inserción del gen *cat* río abajo del gen *putA* y la ubicación de los partidores utilizados para verificar la inserción del gen. Se muestran los geles de agarosa donde se resuelven los productos de PCR para verificar el genotipo de la cepa *E. coli* H10407 *wild type* (B) en comparación a la cepa *E. coli* H10407 *putA::cat* generada (C). St: Estándar de peso molecular 1 kb, 1: Amplificación con partidores que hibridan en regiones externas y flanquean la región de inserción (*putAP* Fw – *putAP* Rev). Amplicones de 1.044 pb para cepa *wild type* y 1.958 pb para cepa marcada. 2: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (*putAP* Fw - EHEC-ETEC *putAP::Cm* (H2+P2)). Amplicón de 1.356 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*. 3: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (EHEC-ETEC *putAP::Cm* (H1+P1) – *putAP* Rev). Amplicón de 1.696 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*.

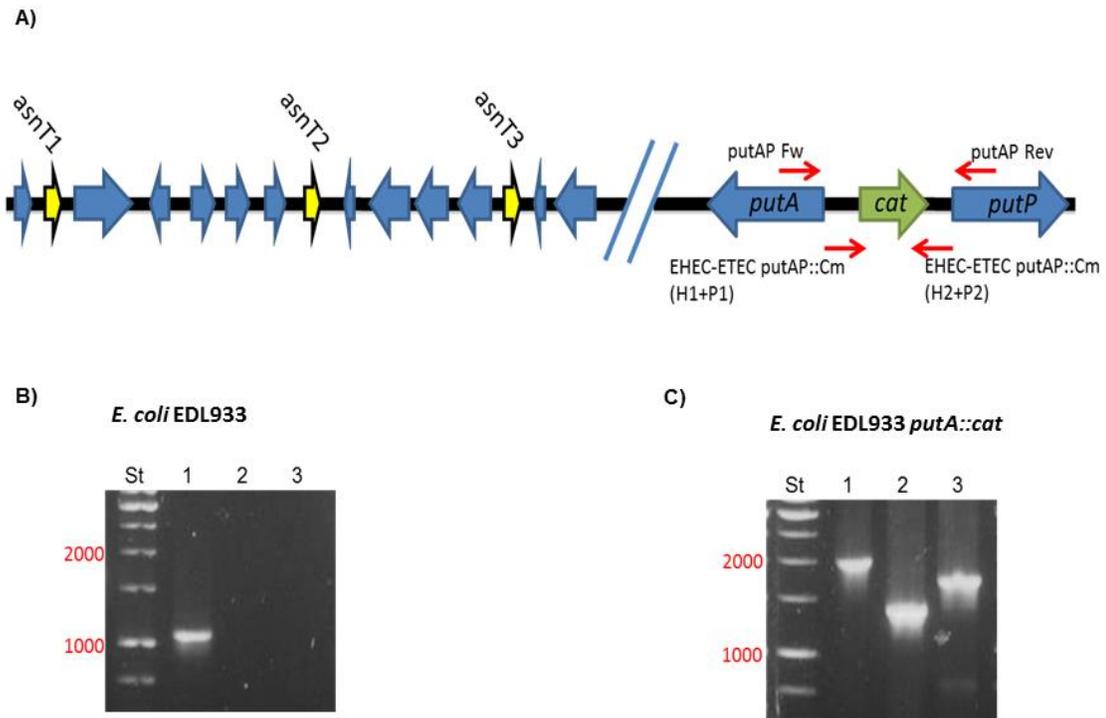


Figura 3-6. Generación de cepa receptora *E. coli* EDL933 *putA::cat*. A) Esquema de la organización génica de los *asnT*-tRNA en *E. coli* EDL933, la región de inserción del gen *cat* río abajo del gen *putA* y la ubicación de los partidores utilizados para verificar la inserción del gen. Se muestran los geles de agarosa donde se resuelven los productos de PCR para verificar el genotipo de la cepa *E. coli* EDL933 *wild type* (B) en comparación a la cepa *E. coli* EDL933 *putA::cat* generada (C). St: Estándar de peso molecular 1 kb, 1: Amplificación con partidores que hibridan en regiones externas y que flanquean la región de inserción (*putAP* Fw – *putAP* Rev). Amplicones de 1.044 pb para cepa *wild type* y 1.958 pb para cepa marcada. 2: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (*putAP* Fw - EHEC-ETEC *putAP::Cm* (H2+P2)). Amplicón de 1.356 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*. 3: Amplificación con mezcla de partidores para verificar direccionalidad del inserto (EHEC-ETEC *putAP::Cm* (H1+P1) – *putAP* Rev). Amplicón de 1.696 pb para cepa marcada y sin producto para cepa *wild type*.

3.5 Transferencia de ROD21 a cepas de *Salmonella* receptoras

Para determinar si ROD21 es capaz de transferirse desde la cepa dadora *S. Enteritidis* ROD21::*aph* a las cepas receptoras *S. Enteritidis* Δ ROD21 *putA*::*cat* y *S. Typhimurium* *putA*::*cat*, y determinar la frecuencia de este evento, se realizaron ensayos de transferencia en medio LB líquido, según se describe en el punto 2.2.5 de Materiales y Métodos.

Luego de 4 h de co-incubación entre la cepa dadora y las receptoras, en ensayos independientes, se logró obtener colonias resistentes a los antibióticos kanamicina y cloranfenicol de forma simultánea, sugiriendo que efectivamente la isla de patogenicidad ROD21 puede ser transferida a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes, indican que en estas condiciones la frecuencia de aparición de cepas de *S. Enteritidis* resistentes a los dos antibióticos es de 1 por cada 7.000.000 de bacterias dadoras aproximadamente, mientras que la frecuencia de aparición de cepas de *S. Typhimurium* resistente a los dos antibióticos es de 1 por cada 35.000.000 de dadoras. Para verificar que las bacterias resistentes a ambos antibióticos eran efectivamente bacterias transconjugantes, se analizó la presencia de ROD21 y de los marcadores de selección mediante PCR en las colonias obtenidas. Se verificó la presencia de ROD21 amplificando el extremo izquierdo (EI), extremo derecho uno (ED1) y extremo derecho dos (ED2) y los genes que otorgan resistencia a kanamicina (*aph*) y cloranfenicol (*cat*), mediante primarios que hibridan en zonas externas al sitio de inserción de ROD21 o del gen *cat* en el cromosoma bacteriano (Figura 3-7). Para las cepas de *S. Typhimurium* resistentes a kanamicina y

cloranfenicol, se amplificó una región del cromosoma presente sólo en este serovar (el extremo izquierdo del fago Gifsy-1), para descartar que las cepas resistentes a kanamicina y cloranfenicol obtenidas se hayan generado por transferencia del gen de *cat* desde *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis* y no por la transferencia de ROD21 desde *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* (Figura 3-7. E, F, G). Como se observa en la Figura 3-7, las cepas resistentes a ambos antibióticos efectivamente adquirieron las islas de patogenicidad ROD21 que posee el gen *aph*, sugiriendo que las bacterias obtenidas en los ensayos de co-incubación corresponden a cepas transconjugantes. Estos ensayos además sugieren que la cepa dadora de *S. Enteritidis* transfiere el elemento episomal generado por la escisión de tipo 2 (Figura 1-1) a las cepas receptoras de *S. Enteritidis*, ya que se logró amplificar desde el genoma de las bacterias transconjugantes el extremo derecho 2 (ED2 en la Figura 3-7).

Para calcular la frecuencia de transferencia, se dividió el recuento de colonias con resistencia doble en 1mL ($\text{kan}^{\text{R}} - \text{cm}^{\text{R}}$) por el número de colonias resistentes a kanamicina (dadoras) (Figura 3-9).

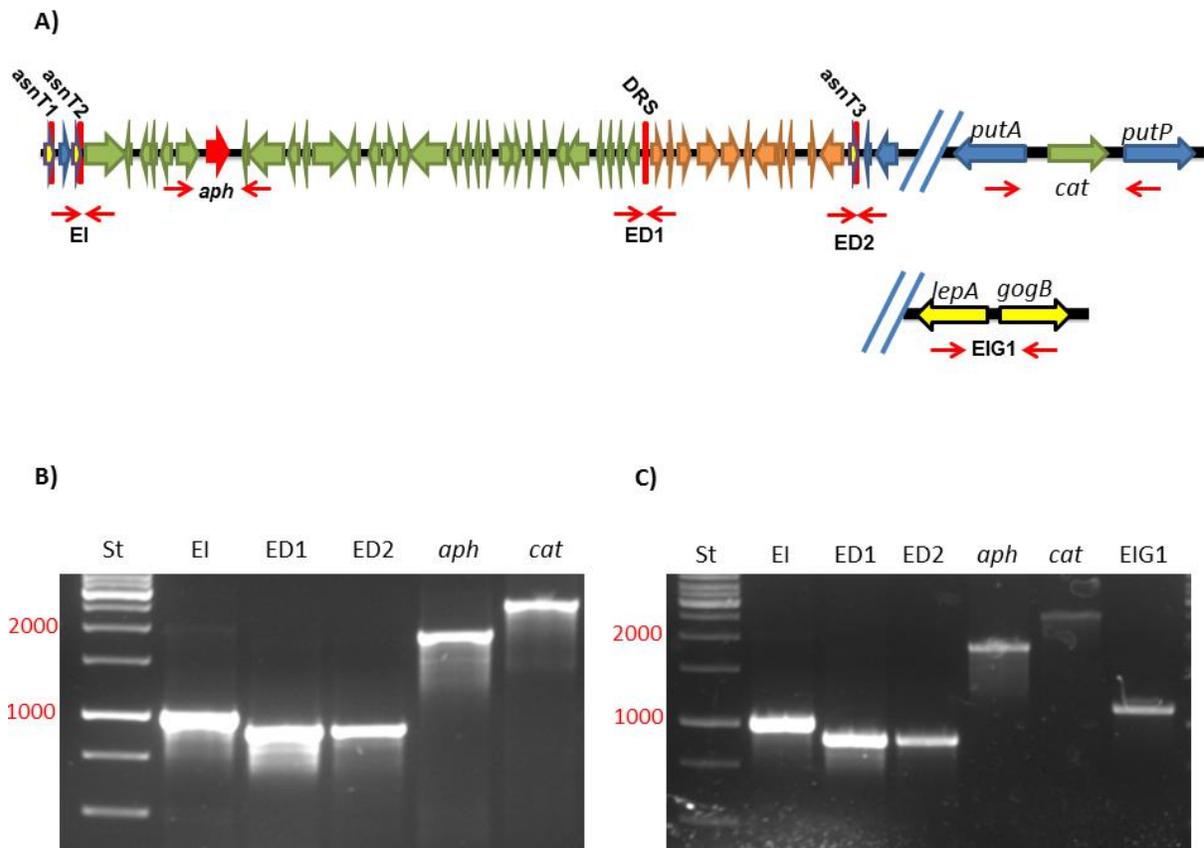


Figura 3-7. Genotipo de bacterias que han adquirido ROD21. A) Esquema del genotipo de cepas resistentes a kanamicina y cloranfenicol y la ubicación de partidores para verificar genotipo. Se muestran geles de agarosa donde se resuelven productos de PCR donde se amplificaron marcadores de la presencia de ROD21 (EI, ED1, ED2) y de los genes que otorgan resistencia a kanamicina (*aph*) y cloranfenicol (*cat*) en *S. Enteritidis* (**B**) y *S. Typhimurium* (**C**). St: Estándar de peso molecular 1 kb, EI: Amplificación de extremo izquierdo de ROD21 (SEN1968 Fw – SEN1970 (int) Rev). Amplicón de 1.011 pb. ED1: Amplificación de extremo derecho uno (SEN1999 Fw – SEN2001 Rev). Amplicón de 914 pb. ED2: Amplificación de extremo derecho dos (ED2) (SEN yeeO Fw – SEN2013 Rev). Amplicón de 903 pb. *aph*: Amplificación de gen *aph* (SEN1975 Fw – SEN1976 Rev). Amplicón de 2.469. *cat*: Amplificación de gen *cat* (*putAP* Fw – *putAP* Rev). Amplicón de 1.943 pb y 1.838 pb, para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* marcadas, respectivamente. EIG1: Extremo izquierdo de Gifsy-1 (EIG1) (*gogB* Gifsy-1 Fw – *LepA* Gifsy-1 Rev). Amplicón de 1.110 pb para cepas de *S. Typhimurium*. Se muestra un gel de agarosa representativo de los clones analizados en cada caso.

Para determinar cuál elemento episomal es transferido e integrado desde *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium*, se amplificó una región de ADN río abajo de la secuencia directa repetida, que está incluida en el elemento episomal producido por la escisión de tipo 2 (escisión entre *asnT-2* y *asnT-3*) (Figura 1-1). Esta región es compartida entre *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*; sin embargo, en esta región existe un fragmento de 50 pb que se encuentra presente sólo en *S. Enteritidis*. Esta secuencia permite discriminar si este fragmento de ADN adquirido por *S. Typhimurium* proviene de *S. Enteritidis* o no en las cepas transconjugantes. Para evaluar esto, se amplificó esta región con partidores específicos que flanquean esta secuencia y posteriormente se secuenció. Al realizar los alineamientos de secuencia (Figura 3-8), se observa que la totalidad de los clones de *S. Typhimurium* que adquirieron ROD21 no poseen la secuencia específica de *S. Enteritidis*, indicando que *S. Typhimurium* adquirió el elemento episomal producido mediante la escisión de tipo 2 y que el sitio de integración en *S. Typhimurium* es la secuencia del gen *asnT-2*.

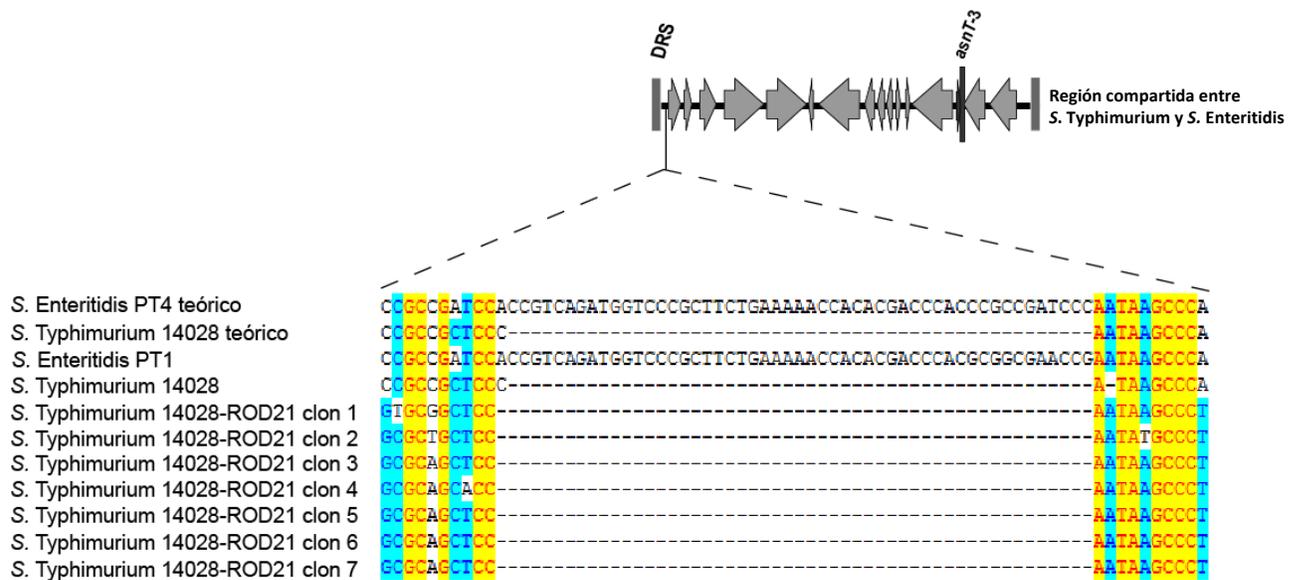


Figura 3-8. Identificación de clones de S. Typhimurium que adquirieron ROD21. Secuenciación y alineamiento de una región de 50 pb río abajo de la secuencia DR presente en S. Enteritidis. Se muestran secuencias teóricas correspondientes a los genomas anotados y disponibles de S. Enteritidis PT4 y S. Typhimurium 14028s en comparación a las cepas de laboratorio S. Enteritidis PT1, S. Typhimurium y clones de S. Typhimurium que adquirieron ROD21.

3.6 Transferencia de ROD21 a cepas de *E. coli* receptoras

Para determinar si ROD21 es capaz de transferirse a otra especie, se eligió la bacteria *E. coli*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, al igual que *Salmonella*. La estrecha cercanía filogenética entre estas dos bacterias y su organización genética similar hace suponer que ROD21 podría integrarse en el cromosoma de las cepas de *E. coli* generadas, puesto que estas bacterias mantienen el sitio de inserción de la isla de patogenicidad, correspondiente a los genes *asnT*-tRNA. Para esto, se utilizaron las cepas *E. coli* H10407 *putA::cat* y *E. coli* EDL933 *putA::cat*, que actuarían como receptoras de esta isla de patogenicidad.

Luego de 4 h de co-incubación de la cepa dadora S. Enteritidis ROD21::*aph* y las cepas de *E. coli* receptoras, en ensayos independientes, no se obtuvo bacterias

resistentes a kanamicina y cloranfenicol, por lo que se aumentó el tiempo de incubación a 5 h, 6 h y 24 h. A pesar de estas modificaciones, no se obtuvieron colonias resistentes a kanamicina y cloranfenicol a ningún tiempo en ensayos independientes realizados en triplicado, a pesar que en todos los tiempos es posible realizar recuentos de dadora y receptora. Estos resultados sugieren que ROD21 no puede ser transferido desde *S. Enteritidis* a *E. coli*, dando indicios de especificidad en la transferencia de esta isla de patogenicidad.

3.7 Determinación del mecanismo de transferencia de ROD21

Para determinar el mecanismo por el cual ROD21 es capaz de transferirse a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, se diseñaron tres experimentos que permitieron conocer si el evento ocurre mediante conjugación, transformación o transducción.

3.7.1 Transferencia de ROD21 en filtro

Para determinar si es necesario el contacto célula-célula en la transferencia de ROD21, se utilizó la técnica de *filter mating assay*, descrita ampliamente para ensayos de conjugación de elementos móviles (47, 48).

Cultivos saturados de la cepa dadora y las distintas receptoras, respectivamente, fueron mezclados y posteriormente retenidos en un filtro de nitrocelulosa estéril de 0,2 μm de tamaño de poro (Millipore) y finalmente puesto en contacto en la superficie de medio agar LB. Luego de 4 h de incubación, se recuperaron las bacterias desde el filtro y del medio sólido, como se describe en el punto 2.2.7.

Se logró realizar recuentos de colonias resistentes a kanamicina y cloranfenicol y dadoras cuando las receptoras fueron *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, aumentando la frecuencia de transferencia en dos órdenes y un orden de magnitud, respectivamente, en comparación a los ensayos de transferencia genética en medio líquido (Figura 3-9).

No hubo bacterias resistentes a kanamicina y cloranfenicol cuando las receptoras fueron cepas de *E. coli* en ningún caso, lo que sugiere que ROD21 no es capaz de transferirse a *E. coli* en las condiciones estudiadas.

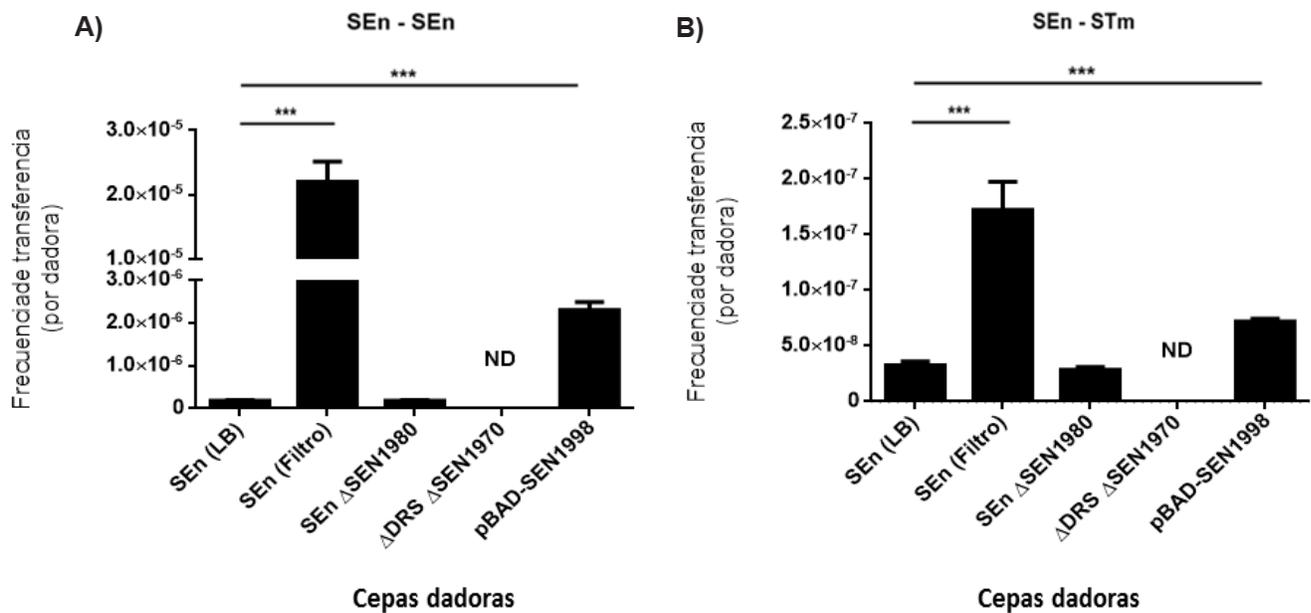


Figura 3-9. Frecuencia de transferencia de ROD21 a cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Resultado de 4 ensayos independientes para transferencia de ROD21 a la cepa receptora (A) *S. Enteritidis* ΔROD21 *putA::cat* y (B) *S. Typhimurium* *putA::cat*. ***: t de Student de dos colas, $p < 0,0001$. ND= no detectado.

3.7.2 Transferencia de ROD21 a partir de ADN de la cepa dadora

Para determinar si la transferencia de ROD21 ocurre mediante transformación natural, se obtuvo ADN cromosomal de la cepa dadora *S. Enteritidis* ROD21::*aph* y

se co-incubó con 1 ng, 10 ng, 100 ng y 1 µg de ADN con todas las diferentes cepas receptoras en medio LB líquido. Al cabo de 4 h, 5 h, 6 h y 24 h no se obtuvo bacterias resistentes a kanamicina y cloranfenicol. Por lo que se concluye que la transferencia de ROD21 no ocurre mediante transformación natural en las condiciones estudiadas.

3.7.3 Transferencia de ROD21 a partir de sobrenadante

Como se ha reportado, los profagos presentes en el genoma de *Salmonella* son capaces de inducirse espontáneamente en cultivos en fase estacionaria, debido a la carencia de nutrientes (49). Para determinar si ROD21 es capaz de transferirse mediante fagos, se filtró un cultivo de la cepa dadora crecida a saturación y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron co-incubaciones del sobrenadante del cultivo no concentrado y filtrado con las cepas de *Salmonella* receptoras generadas en los puntos 3.2 y 3.3.

Al cabo de 4 h, 5 h, 6 h y 24 h no se obtuvo bacterias resistentes a kanamicina y cloranfenicol en ningún caso. Con esto se concluye que la transferencia de ROD21 no ocurre mediante transducción, en las condiciones estudiadas.

3.7.4 El proceso de transferencia requiere de la escisión precisa de ROD21 y de complementación *en trans* para llevarse a cabo

Para determinar si la transferencia de ROD21 es un proceso específico y dependiente de la escisión de la isla de patogenicidad, se utilizó una cepa que no es capaz de escindir ROD21, la cual ha sido descrita previamente (38). La cepa *S. Enteritidis* ΔDR ΔSEN1970::*aph* carece de la secuencia directa repetida que

flanquea la isla en su extremo izquierdo y además carece del gen que codifica la integrasa. En esta región se insertó el gen *aph* que otorga resistencia a kanamicina, como se describe en el punto 2.2.3. Al utilizar esta cepa como dadora en co-cultivo con las distintas cepas receptoras no se obtuvo bacterias resistentes a kanamicina y cloranfenicol. Este resultado indica que para que se lleve a cabo el proceso de transferencia de ROD21, debe ocurrir la previa escisión de la isla de patogenicidad.

Para determinar si la transferencia de ROD21 es dependiente de genes que se encuentran fuera de la isla o si se trata de un elemento integrativo y conjugativo (ICE), se utilizó la cepa *S. Typhimurium* pSLT⁻ que carece del plásmido de virulencia, a la cual se le insertó el gen *dhfr*, que otorga resistencia a trimetoprim. Este plásmido ha sido reportado con homología al plásmido F de conjugación bacteriana con presencia del operón *tra*, responsable de la transferencia de ICEs (50). Dado esto, se generaron cepas de *S. Typhimurium* receptoras resistentes a cloranfenicol y trimetoprim, y dadoras de ROD21 resistentes a cloranfenicol y kanamicina, que carecen del plásmido pSLT, la cual ha sido descrita anteriormente (51). Se realizaron ensayos de transferencia según se describe en el punto 2.2.5 y no se obtuvo colonias resistentes a kanamicina, cloranfenicol y trimetoprim. Este resultado sugiere que el proceso de transferencia requiere de la escisión precisa de ROD21, ya que se requiere de un proceso previo de escisión para que la transferencia se produzca, y de complementación *en trans* para llevarse a cabo, debido a que la isla necesita de la expresión de genes externos a ella para que sea transferida.

3.8 Efecto de condiciones ambientales en la transferencia de ROD21

Numerosos trabajos han reportado que diversas condiciones ambientales afectan la transferencia de material genético (28, 52, 53). Además, nuestro grupo ha demostrado que el ambiente intracelular de células fagocíticas promueve la escisión de ROD21 (37). Con estos antecedentes, se realizó tratamientos con variaciones en las condiciones a las cuales la bacteria pudiera estar sometida durante su ciclo natural, como temperatura, pH y H₂O₂.

Cuando se realizó tratamientos con diferentes temperaturas, se observó un aumento en la frecuencia de transferencia de ROD21 a cepas de *S. Enteritidis*, tanto a 23°C, como a 43°C, siendo estas diferencias estadísticamente significativas entre si, con respecto a las condiciones control a 37°C (Figura 3-10 A). Lo mismo ocurre cuando la isla se transfirió a *S. Typhimurium* (Figura 3-10 B). Estos resultados sugieren que la transferencia de ROD21 se ve aumentada cuando la bacteria se somete a temperaturas distintas de 37°C.

Al analizar el efecto del pH 5 en la transferencia de la isla de patogenicidad, se observa también un aumento en la frecuencia de transferencia de ROD21 a *S. Enteritidis*, siendo este estadísticamente significativo respecto a la condición control a pH 7 (Figura 3-10 C). El mismo efecto se observa cuando la transferencia ocurre a *S. Typhimurium* (Figura 3-10 D). Este resultado indica que valores de pH inferiores a 7 producen un aumento en la transferencia de ROD21 a cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Cuando se realizó tratamientos con peróxido de hidrógeno no se observó diferencias significativas en la frecuencia de transferencia de ROD21, ya sea en *S.*

Enteritidis (Figura 3-10 E) ni en *S. Typhimurium* (Figura 3-10 F). Esto indica que la presencia de peróxido de hidrógeno no afecta la transferencia de ROD21, en las condiciones estudiadas.

En todos los casos se analizó las colonias resistentes a kanamicina y cloranfenicol para verificar la presencia de ROD21 en los tratamientos, dando como resultado el mismo patrón de bandas que la Figura 3-7, indicando en ambos casos, para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, la transferencia exitosa de ROD21 en el sitio de inserción esperado, esto es en el gen que codifica al *asnT*-tRNA².

Además, para verificar si las condiciones de transferencia de ROD21 afectan la escisión de la isla, se realizó cuantificación de la secuencia *attB* presente luego de la escisión de ROD21, según se reportó anteriormente (36). Como se muestra en la Figura 3-11, no se observa variación en la escisión en presencia de peróxido de hidrógeno (Figura 3-11 A), pero sí existe un aumento de la secuencia *attB* en variaciones de temperatura (Figura 3-11 B) y en condiciones de pH = 5 (Figura 3-11 C). Estos resultados concuerdan con las frecuencias de transferencia de ROD21 en distintas condiciones de cultivo, donde se observa que a mayor eventos de escisión existe mayor frecuencia de transferencia de la isla de patogenicidad.

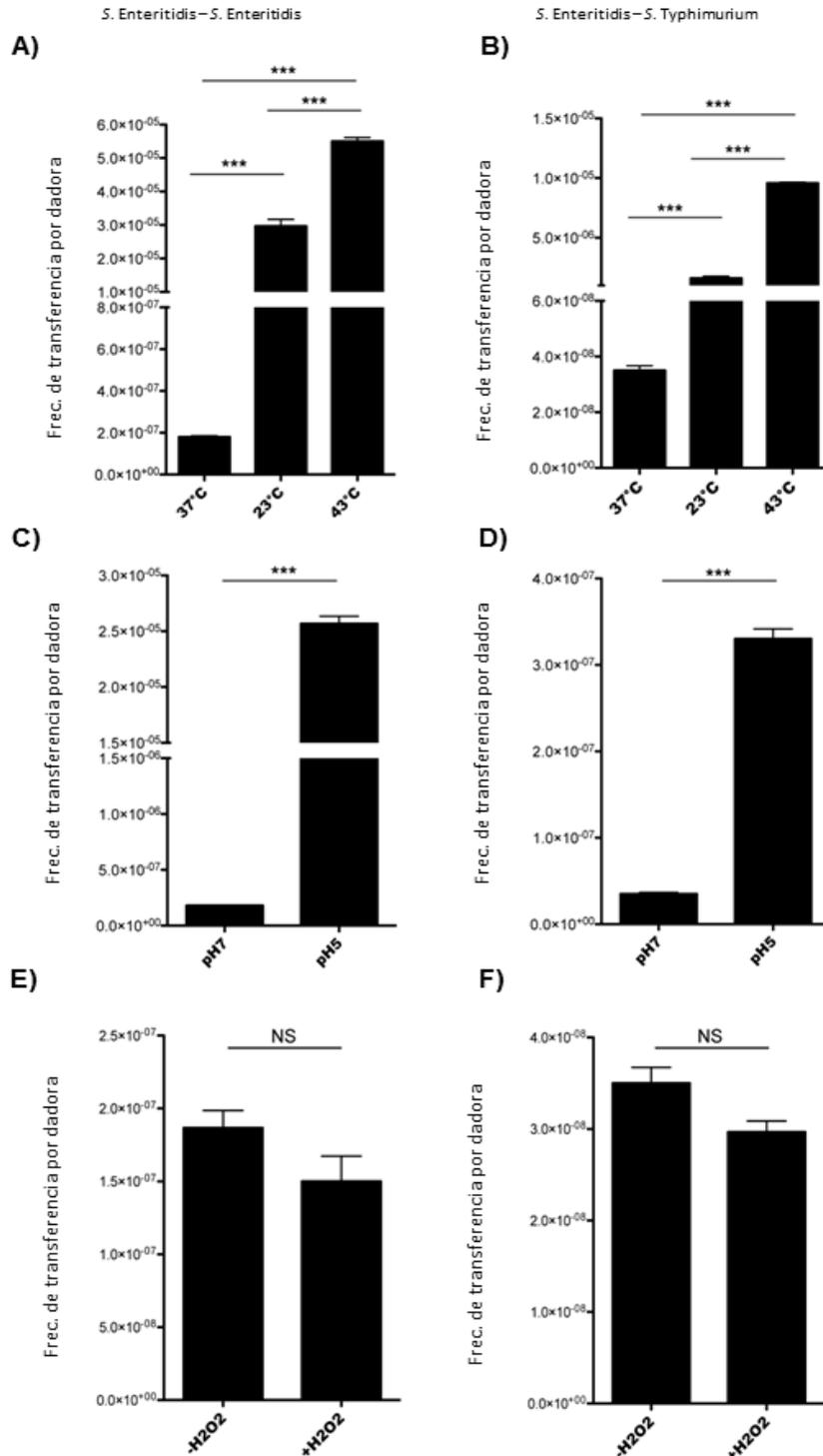


Figura 3-10. Efecto de condiciones ambientales en la transferencia de ROD21. Efecto de variaciones de temperatura en la transferencia de ROD21 a *S. Enteritidis* (A) y *S. Typhimurium* (B). Efecto del pH 5 en la transferencia de ROD21 a *S. Enteritidis* (C) y *S. Typhimurium* (D). Efecto de presencia de peróxido de hidrógeno en la transferencia de ROD21 a *S. Enteritidis* (E) y *S. Typhimurium* (F). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. ***, P<0,05. ANOVA de una vía y test de Tukey *a posteriori* (A-B). T de dos colas (C-F).

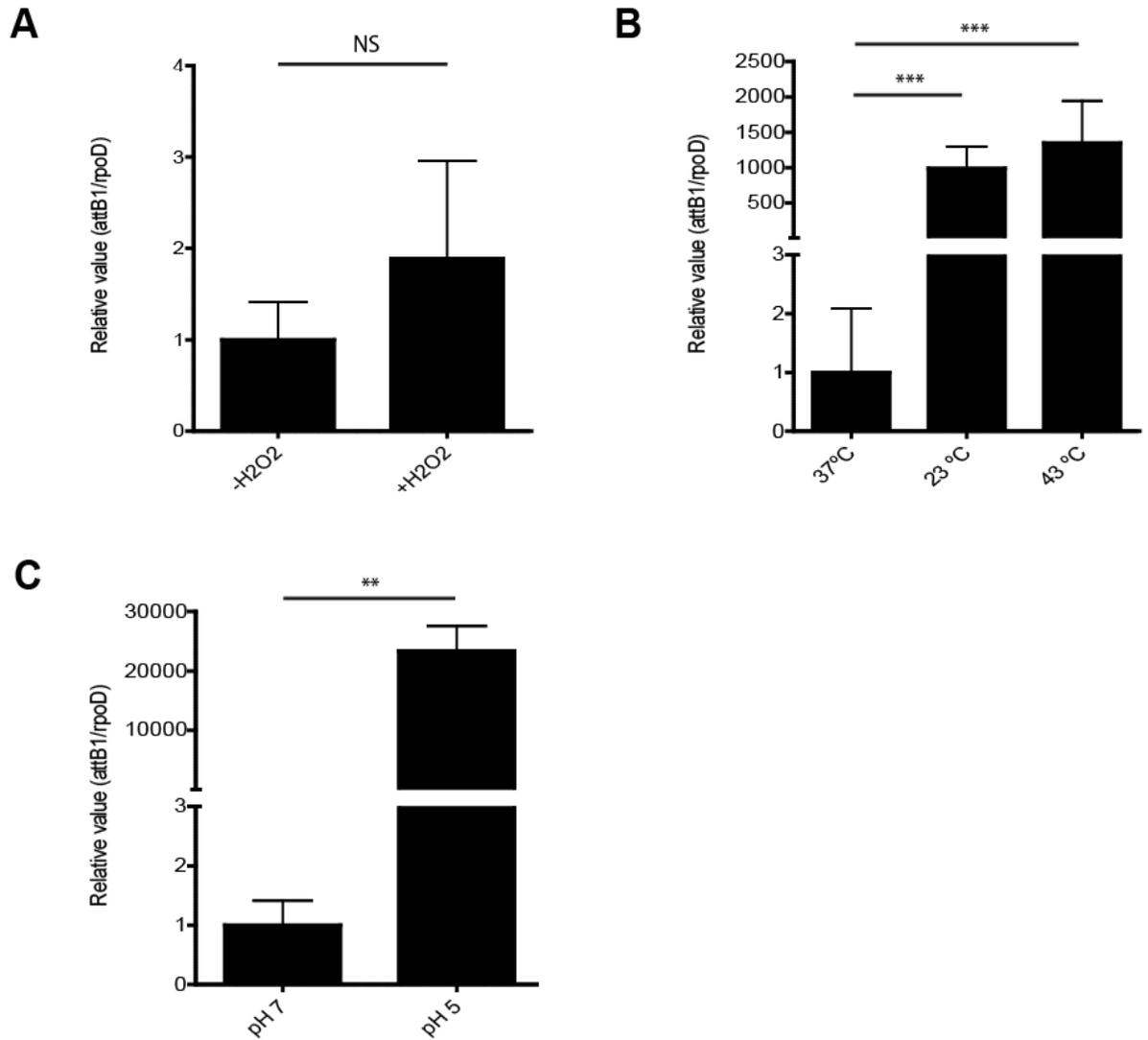


Figura 3-11. Efecto de condiciones ambientales en la escisión de ROD21. Efecto de adición de peróxido de hidrógeno (**A**), variaciones de temperatura (**B**) y pH (**C**) en la escisión de ROD21. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. A y C: t de Student de dos colas, **; $p=0,0048$. NS= no significativo. B: ANOVA de una vía y Test de Tukey *a posteriori*, ***; $p<0,0001$.

3.9 Virulencia de cepas de *S. Typhimurium* que adquirieron ROD21

Al ser ROD21 una isla con genes involucrados en virulencia (32), es necesario determinar si los genes adquiridos por las cepas de *S. Typhimurium* afectan la

capacidad infectiva de esta bacteria. Para esto, se infectaron grupos de 4 ratones machos C57BL/6 vía intragástrica con la cepa de *S. Typhimurium* que adquirió ROD21, además de animales infectados con la cepa *wild type* y controles sin infectar.

Como se muestra en la Figura 3-12, los animales infectados con la cepa *S. Typhimurium*-ROD21 presentan un leve aceleramiento en la letalidad en comparación a la cepa *wild type*, llegando ésta al 100% en el tiempo en ambos casos.

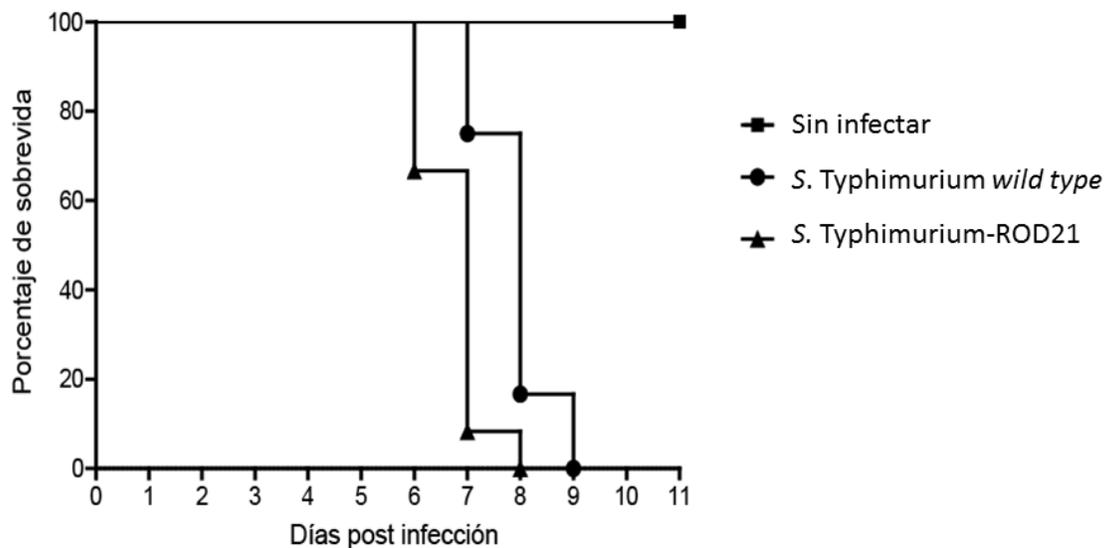


Figura 3-12. Supervivencia de ratones infectados con *S. Typhimurium* que adquirió ROD21. Ratones machos C57BL/6 fueron infectados con 1×10^6 UFC de *S. Typhimurium wild type* o *S. Typhimurium*-ROD21, grupos sin infectar corresponden al control. Se muestran resultados de 4 ensayos independientes. Se realizó análisis de supervivencia *Log-rank* de Kaplan-Meier, las diferencias entre las curvas son estadísticamente significativas $P = 0,0006$.

DISCUSIÓN

La transferencia genética horizontal (TGH) se indica como uno de los principales mecanismos que dan cuenta de la evolución bacteriana, siendo definida como una vía rápida de adaptación a los cambios ambientales, aumentando el *fitness* de la bacteria siendo ésta más exitosa frente a presiones selección del medio (54). Dado lo anterior, *Salmonella enterica* resulta un patógeno interesante desde el punto de vista de su genética, pues en los últimos años, gracias a la secuenciación de genomas, se ha revelado que alrededor de un 10% de su material genético ha sido adquirido mediante TGH (29, 55), teniendo gran impacto en la evolución de *Salmonella*, donde se reportan más de 2.500 serovares.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la transferencia de la isla de patogenicidad ROD21 presente en el cromosoma de *S. Enteritidis* a distintas cepas. ROD21 se descubrió en un estudio de genómica comparativa como una región presente en los serovares Gallinarum, Dublin y Enteritidis (32). Posteriormente, se reportó una región variable en el cromosoma de *S. Typhi*, adyacente a una gen que codifica un *asnT*-tRNA y flanqueada por una secuencia directa repetida, con estructura genética similar a ROD21 (56), haciendo énfasis en la posible movilidad de esta región. Esto nos puede llevar a pensar que esta isla de patogenicidad ha sido adquirida además por otros serovares. En nuestro laboratorio reportamos recientemente esta isla de patogenicidad como un elemento inestable, ya que es capaz de escindirse espontáneamente del genoma en cultivos bacterianos y al infectar células del sistema inmune *in vitro* (37). Se ha reportado en la literatura que algunas islas de patogenicidad que son capaces de escindirse espontáneamente del

genoma de bacterias Gram positivo y Gram negativo tienen la capacidad de transferirse a otras bacterias (47, 57).

Mediante ensayos de transferencia en medio LB líquido, se obtuvo cepas de *S. Enteritidis* que carecían inicialmente de ROD21, y que fueron capaces de integrar la isla en su cromosoma a frecuencias de $1,8 \times 10^{-7}$ (Figura 3-9). A pesar de que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* difieren en alrededor de un 10% de su contenido genético (32), *S. Typhimurium* resultó ser permisiva para la isla de patogenicidad y se obtuvo cepas que integraron ROD21 en su genoma a una frecuencia de $3,2 \times 10^{-8}$ por dadora (Figura 3-9).

Según nuestros resultados previos, ROD21 es capaz de escindirse del cromosoma mediante al menos cuatro eventos de recombinación distintos (Figura 1-1), produciendo a su vez, cuatro elementos episomales. En este estudio la cepa de *S. Enteritidis* utilizada como receptora perdió espontáneamente la isla mediante recombinación entre la segunda y tercera copia del gen *asnT* (Figura 1-1). Los resultados obtenidos en este trabajo dan cuenta de la integración de ROD21 en la cepa de *S. Enteritidis* de tal forma que recuperan la región completa. Es decir, se detecta la integración de la isla en las cepas receptoras mediante la amplificación del extremo izquierdo, región de secuencia directa repetida y extremo derecho, de la misma forma de la cepa *wild type*, en el 100% de los casos (Figura 3-7). Anteriormente, reportamos que la pérdida de la isla era sólo detectable en bacterias que lo hacían mediante recombinación de los genes de *asnT* 2 y 3 (37). Estos datos sugieren que el elemento episomal producido por este tipo de recombinación (*attP2*) (Figura 1-1 C) es transferido e integrado con más frecuencia que los otros, puesto

que en una población existe una mayor cantidad de bacterias que se encuentran perdiendo ROD21 de esta forma.

En el caso de *S. Typhimurium*, este serovar actúa como receptor natural de la isla pues la organización de los genes *asnT* es similar que en *S. Enteritidis*, pero carece de ROD21 (Figura 3-3.A). El genotipo *wild type* de esta cepa carece de la región entre el gen *asnT 2* y la secuencia directa repetida, en comparación a *S. Enteritidis* (Figura 1-1). Al analizar los clones obtenidos que resultaron ser resistentes a kanamicina y cloranfenicol, estas bacterias habían adquirido la isla completa, es decir, presencia de extremo izquierdo de la isla, región de secuencia directa repetida y extremo derecho (Figura 3-7). En este caso, no es posible determinar si la isla fue adquirida mediante transferencia e integración del elemento episomal producido por recombinación entre el gen *asnT 2* y 3 (*attP2*) o el gen *asnT 2* y la secuencia directa repetida (*attP1*), puesto que ambos elementos son capaces de insertarse en la región de integración.

En el caso de *E. coli*, no se obtuvo bacterias transconjugantes a distintos tiempos de co-incubación con la bacteria dadora. Está ampliamente descrito en la literatura que una de las mayores barreras para la transferencia de material genético es la presencia de sistemas de restricción, especialmente para la adquisición de ADN proveniente de especies distintas (7, 58). Otros autores proponen que el principal obstáculo para la adquisición de material genético entre *E. coli* y *Salmonella* es a nivel de identidad de secuencia entre la bacteria dadora y receptora, donde el sistema SOS jugaría una función importante (59-61). Estos datos podrían sugerir las

causas por las cuales las cepas de *E. coli* utilizadas en esta tesis no fueron capaces de integrar ROD21 en su genoma.

Como se ha mencionado anteriormente, la transferencia de material genético puede ocurrir mediante transformación, transducción y conjugación. Debido a la presencia de ORFs con homología a proteínas involucradas en conjugación bacteriana como MobA, TraD, PilS y PilV en ROD21, se podría pensar que este es el mecanismo responsable de la transferencia de ROD21, pero es sabido que operones completos son los responsables de la maquinaria de conjugación en elementos integrativos conjugativos (20). De todas formas, al analizar el mecanismo por el cual ROD21 es transferido se pudo descartar transformación natural, donde las cepas receptoras no fueron capaces de adquirir ROD21 desde ADN de la cepa donante en el medio de cultivo, y transducción, donde las receptoras no integraron ROD21 en su cromosoma a partir de medio de cultivo tratado con DNAsa y donde se asumió que existían fagos libres. Con esto último, se asegura que el evento de movilización ocurre vía conjugación, corroborado mediante ensayos de transferencia en filtro, donde aumenta la frecuencia en dos y un orden de magnitud para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, respectivamente, en comparación a los ensayos en medio líquido (Figura 3-9). Este aumento es, posiblemente, debido a la mayor probabilidad de contacto bacteria-bacteria, que es uno de los principales requerimientos al momento de transferir material genético mediante conjugación. Al utilizar cepas dadoras y receptoras de *S. Typhimurium* que carecían del plásmido de virulencia pSLT no se detectó transferencia de ROD21, lo que indica que esta isla de patogenicidad no posee la maquinaria necesaria para autotransferirse, atribuible principalmente a los

genes presentes en el operón *tra*, los que son responsables de la movilización de elementos genéticos, ya que necesita de estos genes presentes fuera de ella para realizar este proceso. Actualmente, se ha establecido una clasificación para elementos que son capaces de transferirse, pero que no codifican la maquinaria necesaria para esto por sí mismos, llamándolos elementos integrativos movilizables (IME), como el caso de la isla genómica 1 de *Salmonella*, la cual es transferible sólo en presencia de un plásmido con funciones conjugativas (62). Con estos antecedentes, es posible clasificar a ROD21 como un miembro del grupo de los IME.

Como demostramos en nuestro laboratorio, cambios en las condiciones ambientales afectan la escisión de ROD21 (37), lo que hace pensar que también son un factor clave en la transferencia de la isla de patogenicidad. Al analizar el efecto de la temperatura, pudimos observar un aumento en la transferencia, ya sea a 23°C o a 43°C, respecto a 37°C, cuando se transfiere a cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Figura 3-10 A-B). Similarmente, se ha descrito que la transferencia del plásmido R27 de *E. coli* aumenta a bajas temperaturas (25 a 30°C), debido a la sobreexpresión de genes involucrados en movilidad, mediada por H-NS presente en dicho plásmido (63). En ROD21, el ORF SEN1993 tiene homología a la proteína H-NS, lo que podría explicar el aumento en la frecuencia de transferencia. Por lo tanto, en estudios futuros del laboratorio se evaluará la expresión de este gen a diferentes temperaturas. A pesar de que en la literatura se describe que las altas temperaturas disminuyen la transferencia de elementos genéticos, el reservorio natural de *S. Enteritidis* son las aves de corral, cuya temperatura corporal es de alrededor de 43°C (64), lo que podría indicar que la transferencia de ROD21 al

interior de aves donde *S. Enteritidis* habita es un fenómeno constante y dinámico, probablemente para mantenerla en la población bacteriana residente.

Se ha reportado que el pH es capaz de afectar la transferencia de elementos genéticos en el medio ambiente (65-67). Esta condición podría estar presente en el tracto digestivo, donde *Salmonella* se enfrenta a distintos valores de pH, o en el interior de células del sistema inmune, donde se presentan condiciones de acidez leve. Esto podría explicar el aumento de la frecuencia de transferencia de ROD21 a pH 5 para *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Figura 3-10. C-D). Posiblemente, este proceso está mediado por expresión diferencial de genes involucrados en este fenómeno.

Si bien la transferencia de ROD21 aumenta a mayor escisión, estos valores no se ven aumentados en forma directamente proporcional en todos los casos, ya que el elemento episomal producido luego de la escisión podría estar siendo degradado en algunos casos y en otros ser susceptible de ser transferido.

Por otro lado, la adquisición de ROD21 por parte de *S. Typhimurium* produce un cambio en la cinética de mortalidad cuando se compara con la bacteria *wild type*, acelerando levemente la mortalidad (Figura 3-12), probablemente debido a la ganancia del ORF SEN1975, que interviene con la señalización vía receptores tipo Toll en *S. Enteritidis* (33), pudiendo ser más exitosa en la colonización a nivel de intestino.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis indican que ROD21 es una isla de patogenicidad inestable, capaz de transferirse a cepas de *S. Enteritidis* y

S. Typhimurium mediante un mecanismo de conjugación, siendo un evento especie-específico y que es afectado por condiciones ambientales que podrían influir tanto en el ciclo de vida natural de la bacteria como en un proceso infectivo, asegurando la mantención de esta isla de patogenicidad dentro de la población bacteriana.

Conclusiones

1. ROD21 es capaz de transferirse en condiciones in vitro a frecuencias de $1,8 \times 10^{-7}$ por dadora a *S. Enteritidis* y a frecuencias de $3,2 \times 10^{-8}$ por dadora a *S. Typhimurium*.
2. ROD21 no es capaz de transferirse a cepas de *E. coli*.
3. La transferencia de ROD21 ocurre mediante conjugación.
4. Aumento en la frecuencia de escisión produce aumento en transferencia de ROD21.
5. ROD21 necesita de complementación *en trans* para ser transferida.
6. La transferencia de ROD21 es afectada por pH y temperatura, pero no así por peróxido de hidrógeno.

Bibliografía

1. Juhas M, *et al.* (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews* 33(2):376-393.
2. Broudy TB & Fischetti VA (2003) In vivo lysogenic conversion of Tox(-) *Streptococcus pyogenes* to Tox(+) with Lysogenic *Streptococci* or free phage. *Infection and immunity* 71(7):3782-3786.
3. Yasmin A, *et al.* (2010) Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. *Journal of bacteriology* 192(4):1122-1130.
4. Frost LS, Leplae R, Summers AO, & Toussaint A (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology* 3(9):722-732.
5. Kelly BG, Vespermann A, & Bolton DJ (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47(5):951-968.
6. Schmidt H & Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 17(1):14-56.
7. Thomas CM & Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 3(9):711-721.
8. Johnsborg O, Eldholm V, & Havarstein LS (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology* 158(10):767-778.
9. Luo Y & Wasserfallen A (2001) Gene transfer systems and their applications in Archaea. *Systematic and applied microbiology* 24(1):15-25.
10. Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, & Claverys JP (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313(5783):89-92.
11. Kropinski AM, Sulakvelidze A, Konczy P, & Poppe C (2007) Salmonella phages and prophages--genomics and practical aspects. *Methods Mol Biol* 394:133-175.

12. Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, & Wuertz S (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature reviews. Microbiology* 3(9):700-710.
13. Brussow H, Canchaya C, & Hardt WD (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68(3):560-602, table of contents.
14. Brabban AD, Hite E, & Callaway TR (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne pathogens and disease* 2(4):287-303.
15. Flanigan A & Gardner JF (2007) Interaction of the Gifsy-1 Xis protein with the Gifsy-1 attP sequence. *Journal of bacteriology* 189(17):6303-6311.
16. Groth AC & Calos MP (2004) Phage integrases: biology and applications. *Journal of molecular biology* 335(3):667-678.
17. Dale JW & Park SF (2010) *Molecular Genetics of Bacteria* (Wiley).
18. Beaber JW, Hochhut B, & Waldor MK (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427(6969):72-74.
19. Goerke C, Koller J, & Wolz C (2006) Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(1):171-177.
20. Wozniak RA & Waldor MK (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews. Microbiology* 8(8):552-563.
21. Lee CA & Grossman AD (2007) Identification of the origin of transfer (oriT) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 189(20):7254-7261.
22. Llosa M & de la Cruz F (2005) Bacterial conjugation: a potential tool for genomic engineering. *Research in microbiology* 156(1):1-6.

23. Cascales E & Christie PJ (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature reviews. Microbiology* 1(2):137-149.
24. Llosa M & O'Callaghan D (2004) Euroconference on the Biology of Type IV Secretion Processes: bacterial gates into the outer world. *Molecular microbiology* 53(1):1-8.
25. Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M, & de la Cruz Fd F (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology* 45(1):1-8.
26. Fernandez-Astorga A, Muela A, Cisterna R, Iriberry J, & Barcina I (1992) Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in Escherichia coli strains. *Applied and environmental microbiology* 58(1):392-398.
27. Guan J, Wasty A, Grenier C, & Chan M (2007) Influence of temperature on survival and conjugative transfer of multiple antibiotic-resistant plasmids in chicken manure and compost microcosms. *Poultry science* 86(4):610-613.
28. Peterson G, Kumar A, Gart E, & Narayanan S (2011) Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microbial pathogenesis* 51(1-2):1-8.
29. Porwollik S & McClelland M (2003) Lateral gene transfer in Salmonella. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 5(11):977-989.
30. Vernikos GS, Thomson NR, & Parkhill J (2007) Genetic flux over time in the Salmonella lineage. *Genome biology* 8(6):R100.
31. Haraga A, Ohlson MB, & Miller SI (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology* 6(1):53-66.
32. Thomson NR, *et al.* (2008) Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome research* 18(10):1624-1637.
33. Newman RM, Salunkhe P, Godzik A, & Reed JC (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infection and immunity* 74(1):594-601.

34. Turner SA, Luck SN, Sakellaris H, Rajakumar K, & Adler B (2004) Role of attP in integrase-mediated integration of the Shigella resistance locus pathogenicity island of Shigella flexneri. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(3):1028-1031.
35. Hacker J & Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology* 54:641-679.
36. Middendorf B, et al. (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic Escherichia coli 536. *Journal of bacteriology* 186(10):3086-3096.
37. Quiroz TS, et al. (2011) Excision of an unstable pathogenicity island in Salmonella enterica serovar Enteritidis is induced during infection of phagocytic cells. *PloS one* 6(10):e26031.
38. Tobar HE, et al. (2013) Chromosomal excision of a new pathogenicity island modulates salmonella virulence in vivo. *Current gene therapy* 13(4):240-249.
39. Jarvik T, Smillie C, Groisman EA, & Ochman H (2010) Short-term signatures of evolutionary change in the Salmonella enterica serovar typhimurium 14028 genome. *Journal of bacteriology* 192(2):560-567.
40. Garcia-Quintanilla M, Ramos-Morales F, & Casadesus J (2008) Conjugal transfer of the Salmonella enterica virulence plasmid in the mouse intestine. *Journal of bacteriology* 190(6):1922-1927.
41. Crossman LC, et al. (2010) A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic Escherichia coli strain H10407. *Journal of bacteriology* 192(21):5822-5831.
42. Perna NT, et al. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Nature* 409(6819):529-533.
43. Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12):6640-6645.
44. Schmieger H (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular & general genetics* : MGG 119(1):75-88.

45. Maloy SR, Taylor RK, & Stewart VJ (1996) *Genetic analysis of pathogenic bacteria : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.).
46. Hautefort I, Proenca MJ, & Hinton JC (2003) Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of Salmonella gene expression in vitro and during infection of mammalian cells. *Applied and environmental microbiology* 69(12):7480-7491.
47. Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT, & Shankar N (2007) Horizontal transfer of virulence genes encoded on the Enterococcus faecalis pathogenicity island. *Molecular microbiology* 63(2):530-544.
48. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Mereghetti L, & Musser JM (2011) Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC microbiology* 11:65.
49. Garcia-Russell N, Elrod B, & Dominguez K (2009) Stress-induced prophage DNA replication in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9(5):889-895.
50. Rotger R & Casadesus J (1999) The virulence plasmids of Salmonella. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2(3):177-184.
51. Garcia-Quintanilla M & Casadesus J (2011) Virulence plasmid interchange between strains ATCC 14028, LT2, and SL1344 of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Plasmid* 65(2):169-175.
52. Itzek A, Zheng L, Chen Z, Merritt J, & Kreth J (2011) Hydrogen peroxide-dependent DNA release and transfer of antibiotic resistance genes in Streptococcus gordonii. *Journal of bacteriology* 193(24):6912-6922.
53. Stecher B, et al. (2012) Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):1269-1274.

54. Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, & Rappuoli R (2005) The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development* 15(6):589-594.
55. Edwards RA, Olsen GJ, & Maloy SR (2002) Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends in microbiology* 10(2):94-99.
56. Perkins TT, *et al.* (2009) A strand-specific RNA-Seq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella typhi*. *PLoS genetics* 5(7):e1000569.
57. Ramsay JP, *et al.* (2009) A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Molecular microbiology* 73(6):1141-1155.
58. Corvaglia AR, *et al.* (2010) A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(26):11954-11958.
59. Matic I, Taddei F, & Radman M (2000) No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *Journal of bacteriology* 182(20):5922-5924.
60. Rayssiguier C, Dohet C, & Radman M (1991) Interspecific recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* occurs by the RecABCD pathway. *Biochimie* 73(4):371-374.
61. Rayssiguier C, Thaler DS, & Radman M (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342(6248):396-401.
62. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, & Cloeckert A (2005) The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular microbiology* 55(6):1911-1924.
63. Forns N, Banos RC, Balsalobre C, Juarez A, & Madrid C (2005) Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *Journal of bacteriology* 187(12):3950-3959.

64. Giloh M, Shinder D, & Yahav S (2012) Skin surface temperature of broiler chickens is correlated to body core temperature and is indicative of their thermoregulatory status. *Poultry science* 91(1):175-188.
65. Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42(2):73-91.
66. Lorenz MG & Wackernagel W (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews* 58(3):563-602.
67. Williams HG, Day MJ, Fry JC, & Stewart GJ (1996) Natural transformation in river epilithon. *Applied and environmental microbiology* 62(8):2994-2998.