

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico
Molecular, Hematología y Medicina Transfusional

“Presencia del plasmidio pESI conjugativo en cepas chilenas de *Salmonella* Infantis aisladas desde
muestras de planteles avícolas”

Alumna: Ignacia Peredo Moscoso

Tutora: Dra. Cecilia Toro Ugalde

Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM)

Firma: Cecilia Toro Ugalde

Fecha: 22 de Julio del 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico
Molecular, Hematología y Medicina Transfusional

“Presencia del plasmidio pESI conjugativo en cepas chilenas de *Salmonella* Infantis aisladas desde
muestras de planteles avícolas”

Alumna: Ignacia Peredo Moscoso

Tutora: Dra. Cecilia Toro Ugalde

Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM)

Firma: 

Fecha: 22 de Julio del 2022

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

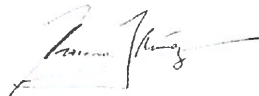
La **Srta. Ignacia Belén Peredo Moscoso**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Presencia del plasmidio pESI conjugativo en cepas chilenas de Salmonella Infantis aisladas desde muestras de planteles avícolas”**, dirigida por la **Profa. Cecilia Shirley Toro** académica del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por el: **Prof. Germán Hermosilla**, académico del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y el **Prof. Felipe Del Canto**, académico Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

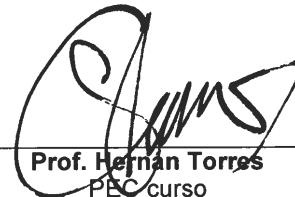
La calificación obtenida se detalla a continuación:

| | | |
|--------------------------------------|-------------|-----|
| Corrector 1 Germán Hermosilla | 6.95 | 25% |
| Corrector 2 Felipe Del Canto | 7.00 | 25% |
| Tutor(es) Guía: | | |
| Evaluación intermedia | 6.60 | 25% |
| Nota final tutor | 7.00 | 25% |
| Nota final tesis profesional | 6.89 | |

En consecuencia la estudiante **Ignacia Belén Peredo Moscoso** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



Prof. Hernán Torres
PEC curso
Trabajo de Investigación

Dedicatoria

Le dedico este trabajo de investigación a mi querida familia que me ha apoyado y animado a lo largo de mi camino académico.

A mis maravillosos padres que son los pilares de mi vida, los amo incondicionalmente.

A mi querida hermanita que siempre me hace reír.

A mi excepcional hermanito que es y será mi mayor inspiración.

A mi gatita Miel que me acompaña todas esas noches de trabajo.

Finalmente dedico a este trabajo a los miembros del laboratorio que cada día me enseñaban y aconsejaban.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora la Dra. Cecilia Toro Ugalde por su apoyo, dedicación e incondicional comprensión a lo largo de este proyecto.

También quisiera agradecer al Programa de Microbiología y Micología del ICBM, especialmente a los Dr. Juan Carlos Salazar, Dr. Felipe Del Canto Fuentes y la Sra. Carolina Arellano por permitirme el uso de sus laboratorios.

Finalmente agradecer a Alhejandra Álvarez por su continua orientación.

Índice de contenido

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 6 |
| Resumen..... | 7 |
| Introducción | 8 |
| Relación del cuadro clínico y el mecanismo de transmisión..... | 8 |
| Epidemiología mundial de <i>Salmonella</i> spp. no tifoidea y la importancia de <i>S. Infantis</i> | 9 |
| Epidemiología de <i>Salmonella</i> spp. no tifoidea (SNT) y el serovar <i>S. Infantis</i> en Chile | 10 |
| Plasmidio emergente de <i>S. Infantis</i> (pESI)..... | 10 |
| Transferencia horizontal genética por medio de plasmidios | 14 |
| Hipótesis..... | 16 |
| Objetivo General..... | 16 |
| Objetivos Específicos: | 16 |
| Materiales y métodos | 17 |
| Características de población estudiada..... | 17 |
| Determinación de genes característicos de pESI..... | 18 |
| Ensayos de conjugación bacteriana | 21 |
| Obtención de una cepa <i>Salmonella</i> receptora de conjugación. | 21 |
| Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)..... | 21 |
| Experimentos de conjugación de pESI | 22 |
| Identificación de conjugantes | 23 |
| Extracción de plasmidios de alto peso molecular | 23 |
| Resultados..... | 25 |
| Detección de genes característicos de pESI en cepas de <i>S. Infantis</i> | 25 |
| Detección del gen de resistencia antimicrobiana <i>fosA3</i> | 25 |
| Extracción de plasmidio de alto peso molecular de pESI..... | 26 |
| Ensayos de conjugación bacteriana | 27 |
| Obtención de conjugantes <i>E. coli</i> | 29 |
| Discusión | 33 |
| Conclusiones | 38 |
| Referencias bibliográficas..... | 39 |
| Anexos..... | 47 |
| Anexo N° 1: Tabla resumen de los grupos de incompatibilidad descrito en las investigaciones y estudios hasta la fecha sobre las características y demás implicados en el plasmidio pESI en <i>S. Infantis</i> | 47 |

| | |
|---|----|
| Anexo N° 2: Variaciones del primer protocolo de conjugación tratado en este estudio | 48 |
| Anexo N° 3: Variaciones del segundo protocolo de conjugación tratado en este estudio | 49 |
| Anexo N° 4: Variaciones del tercer protocolo de conjugación tratado en este estudio | 49 |

Índice de tablas y figuras

| | |
|---|----|
| Tabla N° 1: Características de las cepas de <i>Salmonella</i> Infantis seleccionadas para el estudio | 17 |
| Tabla N° 2: Partidores usados para la determinación de genes característicos de pESI y genes de resistencia antimicrobiana presentes en pESI | 19 |
| Tabla N° 3: Protocolos de PCR | 20 |
| Tabla N° 4: Protocolo de amplificación utilizado | 20 |
| Tabla N° 5: Patrones de resistencia antimicrobiana genotípica | 26 |
| Tabla N° 6: Resumen de resultados obtenidos por PCR convencional para confirmación de la presencia de genes en las conjugantes 12,13,17,18 y 21. | 31 |
| Figura N° 1. Secuencia compuesta del plasmidio pESI | 12 |
| Figura N° 2. Ausencia de la visualización de pESI desde la extracción de plasmidial desde donantes <i>S. Infantis</i> cepas 28,34,41, y 48 | 27 |
| Figura N° 3. Confirmación de la transformación mediante la extracción de pUC18k en las cepas seleccionadas | 28 |
| Figura N° 4. Descarte de conjugantes en ensayos entre <i>S. Infantis</i> cepa 26 y <i>E. coli</i> UC231 por la presencia del gen <i>invA</i> | 29 |
| Figura N° 5. Selección de colonias conjugantes <i>S. Infantis</i> 28/ <i>E.coli</i> UC231 en placas (TET 10µg/mL y N ₃ Na 150 µg/mL) donde se obtuvieron exitosamente conjugantes. | 30 |
| Figura N° 6. Ausencia del amplificado de <i>invA</i> en conjugantes <i>E. coli</i> | 30 |
| Figura N° 7. Presencia de plasmidio de mismo peso molecular en 4/5 conjugantes | 31 |
| Figura N° 8: Detección de presencia del amplificado de <i>traC</i> y ausencia de <i>invA</i> en la extracción de las conjugantes | 32 |
| Figura N° 9: Composición de pESI de <i>S. Infantis</i> cepa 28 mediante <i>SnapGene</i> ® software | 35 |

Abreviaturas

HGT: Transferencia horizontal genética

ICE: Elementos integrativos y conjugativos

pESI: Plasmid of emerging *Salmonella* Infantis

SNT: *Salmonellas* no tifoideas

SAG: Servicio Agrícola y Ganadero de Chile.

Resumen

Salmonella Infantis es un serovar emergente como agente de salmonelosis a nivel mundial, siendo uno de los principales aislados desde fuentes alimentarias/animales. Se caracteriza por la presencia de un plasmidio conjugativo que confiere resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos, metales pesados, y que mejora los fenotipos asociados a la virulencia bacteriana, descrito tanto en cepas aisladas desde animales como desde humanos. Este plasmidio pESI (plasmidio de *S. Infantis* emergente) se describió en el 2014 en Israel y desde entonces se ha reportado en muchos países de Europa y América. En Chile, *S. Infantis* también ha tenido un aumento progresivo, por lo tanto, es posible que este agente se convierta en el más prevalente en un futuro cercano, sin embargo, aún cuando hay antecedentes que sugieren la presencia de pESI en cepas chilenas (Tesis C. Romero, 2019-2020), no ha sido posible demostrar su funcionalidad conjugativa.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del plasmidio pESI conjugativo en cepas de *S. Infantis* aisladas desde muestras de planteles avícolas en Chile. Para esto, se detectó la presencia de genes característicos del plasmidio mediante PCR convencional, se realizaron experimentos de conjugación entre las cepas donantes de *S. Infantis* con la cepa receptora *E. coli* y también se hizo extracción plasmidial de las cepas parentales y conjugantes con el fin de comparar los perfiles obtenidos.

Finalmente, se confirmó la presencia de los genes *repB*, *merA*, *fyuA*, *tra-C* y *pilL* en 29 de las 30 cepas estudiadas, las cuales presentan una amplia variedad de perfiles de resistencia antimicrobiana fenotípico y genotípico. Complementando la caracterización de los genes de resistencia a antibióticos se detectó el gen *fosA3*, lo que permitió distinguir 8 patrones genéticos, de los cuales el perfil más prevalente incluye *tetA*, *aadA1*, *sul1*, *dfrA14*, *floR*, *bla_{CTX-M-65}*, y *fosA3*. Por último, se logró obtener conjugantes de *E. coli* con una de las 5 cepas de *S. Infantis* ensayadas, que adquirió las características fenotípicas y genotípicas de pESI descritas en la cepa parental. Estos resultados confirman la hipótesis que las cepas de *S. Infantis* aisladas desde muestras de planteles avícolas en Chile presentan el plasmidio pESI con la capacidad funcional de conjugación *in vitro*.

Introducción

Salmonella spp. es un género que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, consecuentemente son bacterias Gram negativo y se caracterizan por ser bacilos, anaerobios facultativos, intracelulares facultativos, con flagelo, resistentes a diversas condiciones ambientales y de distribución ubicua. [1,2]

El género *Salmonella* presenta 2 especies: *S. bongori* y *S. enterica*, esta última se clasifica en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). A su vez, en conjunto presentan más de 2600 serovares [2], que se diferencian por los tipos de hospederos que pueden infectar y por las manifestaciones clínicas que producen. La subespecie *enterica* incluye la mayoría de los serovares de importancia clínica, que son asociados a brotes transmitidos por alimentos, al tener la capacidad de infectar humanos y animales, y se destacan por la alta prevalencia en granjas avícolas y porcinas. [2,3]

Los serovares de *Salmonella* spp. se pueden catalogar como: *Salmonella* tifoidea y no tifoidea. *S. Typhi* es el principal representante de la primera categoría y se caracteriza por infectar específicamente a humanos causando la fiebre tifoidea, la cual puede presentarse con fiebre, cefalea, dolor abdominal, entre otros síntomas, que aparecen 10-14 días después de infectarse [2,4]. La segunda categoría la conforman los serovares que poseen una extensa variedad de hospederos (cerdos, ganado, aves, reptiles, entre otros) y en general pueden generar una infección gastrointestinal en el ser humano y cuadros asintomáticos en aves [4], entre ellos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

Relación del cuadro clínico y el mecanismo de transmisión

El cuadro clínico clásico generado por *Salmonellas* no tifoideas (SNT) en personas inmunocompetentes se caracteriza por fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas y vómitos, que pueden ser de aparición aguda (6-72 horas post infección con el agente) y durar hasta 1 semana. Por lo general, la infección es autolimitada, de manera que no hay necesidad de usar tratamientos antimicrobianos. Sin embargo, estos mismos patógenos pueden generar un cuadro más complejo en pacientes inmunodeprimidos, niños (< 3 meses), ancianos y embarazadas, evolucionando a un cuadro sistémico

que puede llegar a una septicemia, situación en que sí se requiere del uso de antibióticos para su tratamiento [2,5]. Este tratamiento es empírico en adultos, por esto se usa fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación o ampicilina, sin embargo, esto varía si se hacen pruebas de susceptibilidad de la cepa, se identifica el serovar y si las condiciones clínicas del paciente empeoran [5,6]. Por otra parte, el único antibiótico recomendado para tratar niños son las cefalosporinas de tercera generación. [7]

Este patógeno se transmite mediante el consumo de alimentos como huevos, carne de aves de corral y porcino, además de productos lácteos contaminados, pero también se puede adquirir si se consume vegetales contaminados con heces de origen animal [2]. Por lo tanto, al considerar la alta prevalencia, la variedad de transmisibilidad y el cuadro clínico inespecífico, no es de extrañar que la salmonelosis sea la segunda infección gastrointestinal transmitida por alimentos que más se notifica en humanos, después de la campilobacteriosis, y además cause brotes alimentarios incluso en países desarrollados de la Unión Europea y en EE. UU. [3, 8]

Epidemiología mundial de *Salmonella* spp. no tifoidea y la importancia de *S. Infantis*

A pesar de la gran variedad de serovares de *Salmonella*, solo 10 son los principales responsables de la mayoría de los casos de salmonelosis y la prevalencia de éstos varía por región. Por ejemplo, de acuerdo a la Unión Europea, los principales serovares encontrados en infecciones en humanos y en fuentes agrícolas (pollos de engorde, bovinos, pavos, gallinas ponedoras y cerdos), aislados tanto de animales como de alimentos, son: *S. Enteritidis* (48,7%), *S. Typhimurium* (12,4%), *S. Typhimurium* monofásico (11,1%), y *S. Infantis* (2,5%) [3]. Pero en Rusia, aunque tiene una coincidencia en los primeros serovares, en tercer lugar, tiene a *S. Infantis* como serovar más frecuente.[9]

Otro panorama se describe en EEUU; en el año 2016, de acuerdo a datos reportados por CDC de casos clínicos, en primer lugar está *S. Enteritidis*, pero en segundo lugar está *S. Newport* y en sexto lugar se encuentra *S. Infantis*, el cual ha tenido un aumento paulatino en su frecuencia desde hace un par de años [10]. Una realidad diferente ocurre en Israel, donde entre los años 2008 al 2015 hubo un aumento

exponencial del serovar *S. Infantis*, que se mantiene a la fecha, convirtiéndolo en el más aislado tanto en infecciones humanas como desde ambientes animales [11]. Por lo general, esta tendencia al aumento de *S. Infantis* como serovar emergente ha existido no solo en los países descritos, sino también en Alemania [12], Suecia [13], India [14], además de Francia e Italia. [3]

En conclusión, se puede decir que *S. Infantis* se considera un serovar emergente a nivel mundial, siendo uno de los principales aislados desde fuentes alimentarias/animales y además desde cuadros de salmonelosis en seres humanos.

Epidemiología de *Salmonella* spp. no tifoidea (SNT) y el serovar *S. Infantis* en Chile

El Instituto de Salud Pública (ISP) hace vigilancia epidemiológica de *Salmonella* spp., determinando la especie, subespecie y serovar, ya que éste es un patógeno que se encuentra en el reglamento de Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria D.S. N°158/2004. Para el año 2019, se publicó que el 20% de los brotes ETA fueron específicamente diagnosticados, y la mitad de éstos fueron salmonelosis, indicando que esta infección es la más prevalente en Chile [15]. Por otra parte, respecto a la prevalencia de los serovares entre los años 2014 - 2018, los primeros lugares no varían respecto a otros países mencionados, pero cabe destacar que *S. Infantis* ha tenido un aumento progresivo desde el 2014 alcanzando un 4,1% (419/10.104) de las muestras aisladas, siendo el tercer serovar más frecuente de SNT [2]. Más aún, al analizar los datos del 2018, *S. Enteritidis* tuvo un aumento del 14,9% (1037 a 1219 casos) respecto al año anterior, pero *S. Infantis* aumentó en un 56,5% (74 a 107 casos) en el mismo periodo de tiempo, lo que evidencia un aumento de progresión rápida, que requiere una vigilancia activa de éste. [2]

Plasmidio emergente de *S. Infantis* (pESI)

Como se ha descrito, *S. Infantis* es un serovar emergente de importancia mundial y nacional. Entre los elementos que están influenciando este aumento en la frecuencia, se ha descrito un factor clave que guarda relación directa con la multirresistencia antimicrobiana descrita en este agente. Precisamente, desde el 2008 hasta el 2014 existió una rápida aparición clonal de este serovar en Israel, por este

antecedente, los estudios en un comienzo sugerían la presencia de un plasmidio conjugativo, capaz de mejorar la supervivencia y la resistencia del serovar. Para el 2014, se le caracterizó y dio nombre a este elemento genético móvil: pESI, que significa plasmidio de *S. Infantis* emergente. [16]

Desde entonces, este plasmidio ha sido descrito en cepas aisladas en Rusia, Alemania, Suecia, Italia, Hungría, Japón, EE. UU., y Perú [9, 12, 13, 17- 21]. La mayoría de estos estudios se han realizado en muestras provenientes de granjas avícolas o de animales, sin embargo, en Perú, Italia y EE. UU. se utilizó además muestras de casos clínicos humanos. Por lo tanto, es un plasmidio que potencialmente podría estar implicado en la aparición de multirresistencia antimicrobiana, de manera que la presencia de pESI en el ambiente clínico asistencial podría eventualmente dificultar el tratamiento antimicrobiano que normalmente se utiliza. Este plasmidio, además de conferir resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos, también se ha asociado con el aumento en la resistencia a metales pesados, desinfectantes y en la virulencia bacteriana. Todas estas características han sido asociadas y encontradas en cepas aisladas tanto de animales como de humanos. [22,23]

pESI también se ha clasificado en base al grupo de incompatibilidad (Inc). Este término hace referencia a la incapacidad de dos plasmidios de mantenerse juntos en la misma bacteria por compartir mecanismos de replicación, entonces, plasmidios de distintos grupos difieren en su rango de hospedero, tamaño y mecanismo de transferencia [24,25]. Por lo general, esta característica varía ampliamente a través de los años y países donde se ha descrito el plasmidio (*Anexo N°1*).

Estructuralmente, se describe a pESI como un plasmidio de tipo quimérico formado por al menos 2 plasmidios ancestrales: replicón *repI* del grupo IncP y genes de transferibilidad conjugativa (*ardA*, *pilL*, *sogS*, *trbA*) del grupo de incompatibilidad IncII [9,22]. Sin embargo, este elemento genético evolucionó, generando un plasmidio de tipo mosaico al presentar también múltiples inserciones de unidades genéticas móviles en su columna vertebral [16], la cual está compuesta por lo general de:

- A. Genes que determinan el grupo de incompatibilidad (inc), que se identifica mediante la proteína de iniciación de replicación plasmidial, a través del gen *rep* [25]; en pESI se ha descrito principalmente a *repI* [9] y *repB* [12].

- B. Un operón yersiniabactina que codifica un sistema de captación de hierro dependiente de sideróforos esencial para la virulencia de *Yersinia pestis* y *Escherichia coli*, entre otros (*fyuA*, *irp1*, *irp2*, *ybtA*, *ybtE*, *ybtP*, *ybtQ*, *ybtS*, *ybtT*, *ybtU*, *ybtX*). [9,16]
- C. Dos operones que codifican fimbrias de tipo *chaperone-usher*: uno que implica la formación de una fimbria similar a K88 y el otro es una fimbria no descrita, ambas relacionadas con el tropismo celular y formación de biopelículas (familia *faeF*, *faeG*, *faeH*, *faeI*, *faeJ*, etc). [9,16]
- D. Genes que codifican sistemas de toxina-antitoxina, que contribuyen al mantenimiento y prevalencia del plasmidio (*pemK/pemI*, *ccdB/ccdA*, *vapC/vapB*). [9,16]
- E. Genes de mantenimiento y transferencia conjugativa (genes *tra*, genes *pili*, *ea*, *psiA*, *ykfF*, etc). [9, 16]
- F. Genes de resistencia antibiótica, transposones e integrones clase I y II. [9, 26]
- G. Un operón *mer*, que confiere un aumento en la tolerancia a mercurio (*merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA*) [9]

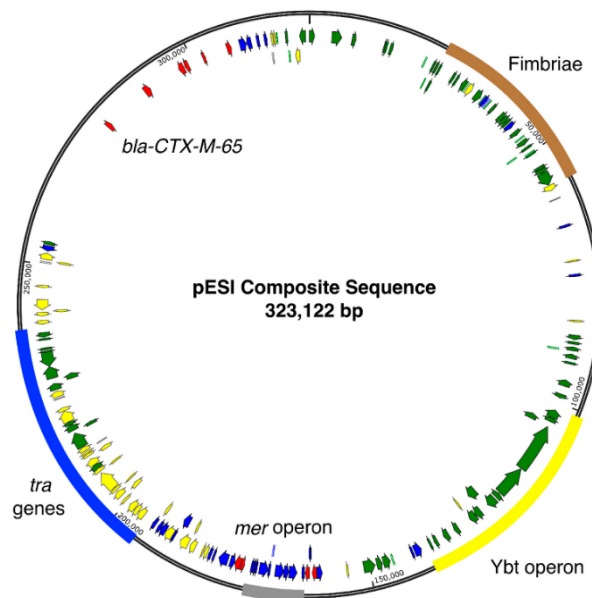


Figura N° 1. Secuencia compuesta del plasmidio pESI.

Se representan genes presentes en 99% (verde), 95% (amarillo) y 90% (rojo) de cepas aisladas desde muestras desde fuentes avícolas e infecciones humanas en EE.UU. desde 2016-2018, por McMillan, et al, 2020. [20]

La principal característica que se mantiene entre los distintos pESI-like descritos es el gran tamaño que presentan al considerarse un mega plasmidio ≥ 300 Kpb. Genes del grupo A permiten clasificar a los plasmidios pESI-like por el grupo de incompatibilidad *inc*. Por otra parte, los elementos del grupo B-D son considerados elementos conservados que han sido descritos en la mayoría de los plasmidios pESI-like en cepas de distintos orígenes. La parte polimórfica de este plasmidio es E, es decir, que siempre están presentes en su estructura, pero hay variaciones en la secuencia de los genes [9]. Las regiones correspondientes a los puntos F y G, en cambio, pueden estar presentes o no en el plasmidio [9]. Por lo tanto, se infiere que ningún plasmidio pESI-like sería idéntico entre sí.

Debido a que la parte variable de este plasmidio incluye genes involucrados en la resistencia antimicrobiana, se han descrito múltiples perfiles de resistencia fenotípica entre distintos pESI-like en estudios de diferentes países. Se ha descrito la presencia de genes de resistencia principalmente a tetraciclina (*tetA/tetR*), trimetoprim (*dfrA14*), betalactámicos de espectro extendido (*blaCTX-M*), sulfonamidas (*sulI*), aminoglucósidos (*aadA*), además de otros antibióticos más específicos e infrecuentes como colistin. [9, 22]

En Chile, el estudio realizado por C. Romero en el año 2019 en el Programa de Microbiología y Micología, ICBM, analizó 60 muestras de *S. Infantis* de planteles avícolas obtenidas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), describiendo los perfiles de resistencia antimicrobiana fenotípica y genotípica, donde se destaca que el 100% de las cepas presenta multirresistencia a tetraciclina, ácido nalidíxico y estreptomina, a los que se suman otros antibióticos de manera variable. Este mismo panorama sobre *S. Infantis* detalla Lapierre et al. en el 2020, pero las muestras usadas fueron obtenidas desde carnes de pollo provenientes de distintos supermercados en Santiago de Chile [27]. Por otra parte, el estudio de Pardo-Este et al. en el año 2021, describe multirresistencia antimicrobiana fenotípica en muestras de planteles avícolas [28]. Por lo tanto, en conjunto estos estudios permiten sugerir la presencia de pESI en las cepas chilenas, pero no se ha confirmado aún.

En el laboratorio del Programa de Microbiología y Micología se continuó el estudio de Romero (2019), secuenciando 3 cepas que representaban los perfiles de resistencia más frecuentes. Mediante

análisis bioinformático, se evidenció la presencia de pESI cuyo grupo de incompatibilidad es FIB (*repB*). [29]

Transferencia horizontal genética por medio de plasmidios

pESI ha sido descrito como un plasmidio que se transfiere por medio de conjugación, es decir, que posee sistemas genéticamente complejos, que permiten la transferencia horizontal de este elemento genético por conjugación. Para ello, los componentes esenciales son el origen de transferencia (*oriT*), genes *mob* y genes *mate-pair formation (MPF)*, en conjunto, estos últimos se denominan genes *tra* [30]. Para que comience la conjugación debe unirse la proteína denominada relaxosoma codificada por genes *mob*, con el *oriT*, y entonces se transfiere a través del sistema de secreción tipo IV que involucra la formación de un poro y pili que permite finalmente el traspaso del plasmidio a otra bacteria [25]. Estos genes involucrados en la formación del relaxosoma y replicón son utilizados para la tipificación de plasmidios en grupos de incompatibilidad, por lo tanto, el grupo al que pertenece un plasmidio también influye en su capacidad de conjugarse [30]. En el caso de pESI, como se ha mencionado, presenta genes variables relacionados con este sistema (*traC*, *pili V*, *S*, etc). [21,31]

Se ha descrito que el traspaso de pESI *in vitro* a *E. coli* e *in vivo* a otros serovares de *Salmonella* es de baja eficiencia y se ve afectado por múltiples parámetros ambientales [22,23]. Condiciones como la alta osmolaridad, 1,4% de oxígeno en el medio, un pH de 5 a 7 y baja concentración de sales biliares (< 1%) mejoran la eficiencia de la conjugación de pESI. Estas condiciones justamente coinciden con aquellas encontradas en animales de cuerpo caliente [23], sugiriendo que la transferencia de este plasmidio tendría el ambiente perfecto en el hospedero humano además de otros animales de cuerpo caliente. También hay evidencia que ciertas condiciones del ambiente son necesarias e influyen fuertemente en la activación y efectividad de este sistema para la conjugación, que también dependen fuertemente del grupo de incompatibilidad presente en el plasmidio. [30,32,33]

En el laboratorio del Programa de Microbiología y Micología hasta la fecha no ha sido posible realizar exitosamente una conjugación *in vitro* desde cepas de *S. Infantis* a otras bacterias intra e

interespecie (*E. coli*, por ejemplo), y por lo tanto solo existe el antecedente teórico de la capacidad conjugativa de pESI en las cepas descritas en Chile. Considerando lo descrito, es de suma importancia el comprender las propiedades de transferencia de los plasmidios clínicamente relevantes, como es pESI, ya que así se podrá entender el posible papel de este mecanismo en la propagación del fenotipo de multirresistencia a los antibióticos entre patógenos de la misma especie o con bacterias que forman parte de la microbiota humana.

Hipótesis

Las cepas de *Salmonella* Infantis aisladas desde muestras de planteles avícolas en Chile presentan el plasmidio pESI con la capacidad funcional de conjugación *in vitro*

Objetivo General

Evaluar la presencia del plasmidio pESI conjugativo en cepas de *Salmonella* Infantis aisladas desde muestras de planteles avícolas en Chile.

Objetivos Específicos:

- Determinar la presencia de genes específicos del plasmidio pESI en las cepas aisladas desde muestras de planteles avícolas 2016-2019 en Chile
- Evaluar la capacidad de conjugación del plasmidio pESI

Materiales y métodos

Características de población estudiada

La población bacteriana utilizada en este estudio se obtuvo a partir de las cepas de *Salmonella* Infantis provistas por el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG), provenientes de planteles avícolas de la Región Metropolitana y VI Región. Se seleccionaron 30 cepas que son representativas de los principales patrones de resistencia antimicrobiana fenotípica, de acuerdo con lo descrito en la *Tabla N°1* basado en el trabajo de tesis de Romero, C (2019).[26]

Tabla N° 1: Características de las cepas de Salmonella Infantis seleccionadas para el estudio

| N° | CEPA | AÑO | REGIÓN | TET | NAL | STR | FFC | CHL | TMP | SXT | CEF | AMP | GEN | ENR |
|----|------------------|------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | S. Infantis - 26 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | R | R | R | R | I | S |
| 2 | S. Infantis - 38 | 2018 | VI región | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S |
| 3 | S. Infantis - 51 | 2017 | VI región | R | R | I | R | R | R | R | R | R | I | S |
| 4 | S. Infantis - 71 | 2018 | RM | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S |
| 5 | S. Infantis - 28 | 2017 | RM | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | I |
| 6 | S. Infantis - 67 | 2017 | VI región | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | I |
| 7 | S. Infantis - 27 | 2018 | RM | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| 8 | S. Infantis - 29 | 2017 | RM | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| 9 | S. Infantis - 36 | 2017 | RM | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| 10 | S. Infantis - 76 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| 11 | S. Infantis - 34 | 2018 | RM | R | R | I | R | R | S | S | R | R | I | R |
| 12 | S. Infantis - 68 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | S | S | R | R | I | I |
| 13 | S. Infantis - 1 | 2018 | RM | R | R | R | R | R | R | R | S | S | I | S |
| 14 | S. Infantis - 8 | 2018 | RM | R | R | I | R | R | R | R | S | S | I | S |
| 15 | S. Infantis - 9 | 2018 | RM | R | R | R | R | R | R | R | S | S | I | S |
| 16 | S. Infantis - 13 | 2018 | RM | R | R | R | R | R | R | R | S | S | I | S |
| 17 | S. Infantis - 33 | 2017 | RM | R | R | R | R | R | S | S | R | R | I | S |
| 18 | S. Infantis - 41 | 2016 | VI región | R | R | I | R | R | S | S | R | R | R | S |
| 19 | S. Infantis - 2 | 2018 | RM | R | R | I | R | R | S | S | R | R | S | I |
| 20 | S. Infantis - 42 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | R | R | S | S | S | S |
| 21 | S. Infantis - 70 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | R | R | S | S | S | S |
| 22 | S. Infantis - 49 | 2017 | VI región | R | R | I | R | R | S | S | R | R | S | S |
| 23 | S. Infantis - 19 | 2018 | VI región | R | R | I | R | R | S | S | S | S | S | S |
| 24 | S. Infantis - 37 | 2018 | VI región | R | R | I | S | S | R | R | S | S | S | S |
| 25 | S. Infantis - 64 | 2018 | VI región | R | R | I | S | S | R | R | S | S | S | S |
| 26 | S. Infantis - 7 | 2018 | RM | R | R | I | S | S | S | S | I | S | S | I |
| 27 | S. Infantis - 44 | 2018 | RM | R | R | R | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 28 | S. Infantis - 48 | 2018 | RM | R | R | I | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 29 | S. Infantis - 72 | 2018 | VI región | R | R | I | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 30 | S. Infantis - 23 | 2018 | Inglaterra | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

R Resistente **I** Resistencia intermedia **S** Sensible

TET: Tetraciclina, NAL: Ácido nalidíxico, STR: Estreptomina, FFC: Florfenicol, CHL: Cloranfenicol, TMP: Trimetoprim, SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim, CEF: Cefalotina, AMP: Ampicilina, GEN: Gentamicina y ENR: Enrofloxacin

Se usó la cepa *E. coli* UC231 como receptora de conjugación, que presenta resistencia a azida de sodio (NaN₃), donada gentilmente por el Dr. Gerardo González, Universidad de Concepción. Todas las cepas se cultivaron en placas de agar Luria (AL) suplementadas con uno de los antibióticos al que fueran resistentes y en placas SS y McConkey, con el fin de visualizar la mayor cantidad de características fenotípicas para diferenciarlas en los futuros experimentos de conjugación.

Determinación de genes característicos de pESI

Para la identificación de alguno de los genes característicos de pESI, descritos anteriormente, se realizó PCR convencional, utilizando partidores para 9 genes (*Tabla N°2*), los cuales identifican:

- *repB*: gen que codifica la proteína de iniciación de replicación plasmidial en plasmidios del grupo de incompatibilidad FIB.[34]
- *merA*: gen representante del operón de resistencia a mercurio
- *fyuA*: gen representante del operón para sideróforo yersiniabactina
- *traC-2*: gen que codifica la ATPasa requerida para la formación del pili de secreción tipo IV en plasmidios F (VirB4). [35]
- *pilL*: gen que codifica la lipoproteína de membrana externa implicada en la biosíntesis del pili.[36]
- *fosA3*: gen que confiere resistencia a fosfomicina
- *floR*: gen que confiere resistencia a florfenicol y cloranfenicol
- *bla_{CTX-M}* grupo 9: gen que confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación [37]
- *dfrA14*: gen que confiere resistencia a trimetoprim

Tabla N° 2: Partidores usados para la determinación de genes característicos de pESI y genes de resistencia antimicrobiana presentes en pESI

| Clasificación general | Gen | Partidor | Secuencia (5' → 3') | Tamaño producto | Referencia |
|--|------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------|--------------|
| Grupo de incompatibilidad FIB | <i>repB</i> | <i>repB</i> F | CAGTAGCCCTCATGCGACTC | 451 pb | Este estudio |
| | | <i>repB</i> R | GGCTCCGCCTTAATCTCAAC | | |
| Operón <i>mer</i> | <i>merA</i> | <i>merA</i> F | CAGTGGAAAGTCCAGTACGGAG | 526 pb | [16] |
| | | <i>merA</i> R | CTGGGCAGAAACGACAAGAC | | |
| Operón para el sideróforo yersiniabactina | <i>fyuA</i> | <i>fyuA</i> F | CCGCATACAGTGACCTGACC | 400 pb | Este estudio |
| | | <i>fyuA</i> R | CCGACCGGACCAGAGTAGAG | | |
| Genes involucrados en el mantenimiento y transferencia conjugativa | <i>traC-2</i> | <i>traC-2</i> F | AGAATGCCGGACTGGTTCTG | 642 pb | Este estudio |
| | | <i>traC-2</i> R | TCATGTTGCCTCCATCCACC | | |
| | <i>pilL</i> | <i>pilL</i> F | AACCACTATCTCGCCAGCAG | 316 pb | [17] |
| | | <i>pilL</i> R | CCATATGACCATCCAGTGCG | | |
| Genes de resistencia antimicrobiana | <i>fosA3</i> | <i>fosA3</i> F | GCCGTCAGGGTCGAGAAA | 282 pb | [38] |
| | | <i>fosA3</i> R | GCGTCAAGCCTGGCATT | | |
| | <i>floR</i> | <i>floR</i> F | CCTATCGCCGGAGCATTGAT | 463 pb | [26] |
| | | <i>floR</i> R | TGAAGGTGAGGAATGACGGC | | |
| | <i>bla_{CTX-M}</i> grupo 9 | <i>bla_{CTX-M-9}</i> F | CAAGCCTGCCGATCTGGT | 559 pb | [39] |
| | | <i>bla_{CTX-M-9}</i> R | GATTCTCGCCGCTGAAGC | | |
| | <i>dfrA14</i> | <i>dfrA14</i> F | TTAACCCAGGATGAGAACCT | 510 pb | [26] |
| | | <i>dfrA14</i> R | CGATTGCATAGCTTTGTAA | | |

Para la realización del PCR convencional se utilizó como templado el DNA bacteriano obtenido de lisado celular, para lo cual se homogenizó colonias de las cepas de interés en 500 µL de agua mili Q estéril, luego se calentó a 100°C en un *termoblock* o incubadora en seco por aproximadamente 15 minutos, se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C y finalmente el sobrenadante se traspasó a otro tubo eppendorf estéril. Los lisados se almacenaron a -20°C antes de su uso.

Los protocolos que se utilizaron para las reacciones de PCR se describen en la *Tabla N°3*:

Tabla N° 3: Protocolos de PCR

| 1 REACCIÓN DE PCR | | |
|-------------------------------------|---|-------------|
| Partidor | <i>merA, fyuA, traC-2, pill, fosA3, floR, bla_{CTX-M-9}, dfrA14</i> | <i>repB</i> |
| Lisado Bacteriano | 2 µL | 2 µL |
| MgCl ₂ 25 mM | 0,75 µL | 0,75 µL |
| dNTPs 10 µM | 0,09 µL | 0,09 µL |
| Partidor <i>rrsH</i> (0,5 µM) F | 1 µL | 1 µL |
| Partidor <i>rrsH</i> (0,5 µM) R | 1 µL | 1 µL |
| Partidor respectivo (1 µM) F | 2 µL | 3,5 µL |
| Partidor respectivo (1 µM) R | 2 µL | 3,5 µL |
| Buffer PCR 5x @Promega | 3 µL | 3 µL |
| Go Taq Polimerasa @Promega | 0,075 µL | 0,075 µL |
| H ₂ O Ultrapura para PCR | 3,085 µL | 0,085 µL |
| Total | 15 µL | 15 µL |

Para cada reacción se incluyeron los partidores para amplificar simultáneamente el fragmento de interés y un fragmento de 1530 pb del gen *rrsH* que codifica el RNA 16S como control interno (F 5' AAG GAG GTG ATC CAG CCG 3' y R 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC 3'). El protocolo de amplificación utilizado se describe en la Tabla N°4:

Tabla N° 4: Protocolo de amplificación utilizado

| ETAPA | <i>merA, fyuA, traC-2, pill, fosA3, repB, dfrA14</i> | | <i>floR</i> y <i>bla_{CTX-M-9}</i> | |
|--------------------------|--|-------------|--|-------------|
| | T° | Tiempo | T° | Tiempo |
| DESNATURALIZACIÓN | 95°C | 2 minutos | 95°C | 2 minutos |
| 30 CICLOS | | | | |
| DESNATURALIZACIÓN | 95°C | 30 segundos | 95°C | 30 segundos |
| ALINEAMIENTO | 55°C | 30 segundos | 60°C | 30 segundos |
| EXTENSIÓN | 72°C | 1 minuto | 72°C | 1 minuto |
| | 72°C | 5 minutos | 72°C | 5 minutos |
| FINALIZACIÓN | 12°C | ∞ | 12°C | ∞ |

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 0,5X, durante 45 - 50 minutos a 100V. En estos geles se cargó el total del producto de PCR, usando como control de tamaño molecular el Ladder Quick-Load® 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs y se usó el colorante fluorescente GelRed Safeview plus® de Fermelo Biotec (Diluido 1/10.000) para intercalar el amplificado y así visualizar los resultados en un transiluminador UV.

Ensayos de conjugación bacteriana

Obtención de una cepa *Salmonella* receptora de conjugación.

Con el fin de obtener una cepa de *Salmonella* receptora de conjugación se transformó la *Salmonella* Infantis cepa 23 (sensible a los todos antibióticos estudiados) con el plasmidio pUC18K, que confiere resistencia ampicilina y kanamicina. Se obtuvo el plasmidio desde *E. coli*/pUC18K a través de la extracción mediante kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA mini kit II se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 0,5X que se corrió por 45 minutos a 100V.

Para realizar la transformación, se cultivó un inóculo de 3 mL LB de la cepa *S. Infantis* 23 *overnight* (*on.*) a 37°C, al día siguiente se hizo un subcultivo al 1 % (30 mL LB + 300 µL del caldo *on.*) y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a 0,5. El cultivo se puso en hielo y se lavó 3 veces con agua mili Q estéril, fría, centrifugando cada vez a 7.500 rpm a 4°C por 20 minutos. Se hizo un cuarto lavado con glicerol 10% estéril frío y se resuspendió en 50 µL de la misma solución. A esta suspensión se le agregó 7 µL del plasmidio pUC18K, se transfirió a una cubeta (separación de 1 mm) y se transformó usando el electroporador 2510 Eppendorf ®. Se dio un pulso de 1.800V por 1,2 milisegundos y se recuperó el contenido con 1 mL de LB por 1 hora a 37°C con agitación. Luego se sembró en placas de AL suplementadas con kanamicina 50 µg/mL, dejándolas a 37°C *on.*

Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM)

Con el fin de conocer las concentraciones adecuadas de antibióticos de selección para las conjugaciones, se determinó la CIM mediante diluciones en caldo usando azida de sodio, kanamicina y

cloranfenicol. Para esto, se prepararon 3 mL de caldo Luria sembrados con las donantes (*S. Infantis* cepas 23,26,28,34,41,48) y las receptoras (*E. coli* UC231 y *S. Infantis* 23/pUC18k) que se dejaron *on.* a 37°C con agitación. Al día siguiente, a partir de soluciones *stock* de los antibióticos se prepararon soluciones de Azida de sodio 300 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 50 µg/mL con las cuales se prepararon diluciones en base 2 en volumen final de 2,5 mL. Se sembraron 10 µL de cada cepa en los distintos antibióticos y se incubaron a 37°C *on.* Al día siguiente, la interpretación se hizo de manera visual para distinguir el último tubo con la menor concentración que registró inhibición del crecimiento bacteriano.

Experimentos de conjugación de pESI

Se hicieron conjugaciones usando 5 cepas de *S. Infantis* como donantes, cada una de las cuales representa un patrón de resistencia antimicrobiana fenotípica (cepas 26, 28, 34, 41 y 48); por otra parte, se usaron *E. coli* UC231 y *S. Infantis* 23/pUC18k como receptoras, que presentan resistencia a azida de sodio y kanamicina respectivamente como marcador de selección. Para estos experimentos se usaron 3 protocolos principalmente:

- A. El primer protocolo corresponde a lo descrito por Miranda et al, 2016 [40], donde las bacterias se crecieron hasta fase logarítmica y la conjugación se hizo en caldo Luria en proporción 1:1 de donante y receptora. A este protocolo se le hicieron una serie de variaciones mencionadas en el *Anexo N°2*.
- B. El segundo protocolo fue descrito por Aviv et al, 2014 [16], que se diferencia del anterior en que las bacterias se crecieron hasta fase estacionaria y la conjugación se realizó en placas de agar Luria. Las variaciones estudiadas se detallan en el *Anexo N°3*.
- C. El tercer protocolo de conjugación fue descrito por Aviv et al, 2016 [23], que se diferencia del anterior por el crecimiento de las bacterias conjugantes en microaerobiosis. Las variaciones de este protocolo se describen en el *Anexo N°4*.

De todas estas variaciones, el protocolo que permitió obtener conjugantes comenzó con la preparación de inóculos de las donantes con el respectivo antibiótico y las cepas receptoras en 5 mL de caldo Luria, a 37°C *on*. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo y se resuspendió el *pellet* en la misma cantidad de caldo Luria sin antibiótico. Se mezcló en un tubo 400 µL de la cepa donante + 4 mL de la cepa receptora. Luego se incubó en condiciones de microaerobiosis, obtenida mediante el uso de una jarra con vela (“*Candle jar*”) incubada a 37°C por 18 - 22 horas. Terminado este tiempo, se sembró la transconjugación en placas de selección de la siguiente manera: una placa se dividió en 8 secciones donde se sembró la cepa donante, receptora y 10 µL de la conjugación en duplicado de una dilución seriada en base 10 (10⁻¹ a 10⁻⁴); en otra placa se sembró 150 µL de la conjugación concentrada y se expandió con rastrillo. Ambas placas se incubaron a 37°C *on*.

Identificación de conjugantes

Aquellas colonias que crecieron en las placas de selección se traspasaron en el mismo medio de selección. Luego, se prepararon lisados bacterianos que se utilizaron como templado para las reacciones de PCR convencional. Para diferenciar las cepas donantes de las cepas receptoras, se estudió la presencia del gen *invA* (F: 5’ GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA 3’ y R: 5’ TCATCGCACCGTCAAAGGAACC) [41], que es específico para el género *Salmonella*, usando el protocolo descrito anteriormente para el grupo de genes que incluye *repB*. Una vez comprobada esta diferencia, se detectaron mediante PCR los genes de pESI en las conjugantes.

Extracción de plasmidios de alto peso molecular

Para aislar el plasmidio pESI se realizaron 2 protocolos de lisis alcalina, de los cuales uno fue descrito y modificado por Silva et al en el 2017 [42] y el otro se describe con más detalle ya que permitió visualizar estos plasmidios.

Se incubó 10 - 15 mL LB inoculados con las cepas correspondientes a 37°C *on* con agitación. Luego se centrifugó a 7500 rpm a 4°C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con 350 µl de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM),

se agregó 2 μL de RNAsa (20 mg/mL) y se dejó en hielo por 10 -15 minutos. Se agregaron 700 μL de la solución desnaturalante (NaOH 0,2 M y SDS 1%), se homogeneizó por inversión y se incubó en hielo por 15 minutos. Se agregaron 450 μL de acetato de sodio 3 M pH 5,2, se homogeneizó por inversión y se dejó en hielo por 20 minutos. A continuación, se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Se recuperó 800 - 900 μL de sobrenadante que se transfirió a otro tubo donde se agregó 800 μL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogeneizó por agitación vigorosa. Se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C, de esto se recuperó la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo. Para precipitar el DNA, se agregó 60% de isopropanol, se homogeneizó y dejó a temperatura ambiente por 15 minutos, luego se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C. El *pellet* de DNA formado se lavó con etanol 70% y se centrifugó por 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C. Se dejó evaporar el etanol restante, se resuspendió el *pellet* en 20-50 μL de solución TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM) dependiendo del rendimiento de la extracción y se almacenó a -20°C.

La extracción plasmidial se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE 0,5X con colorante fluorescente GelRed Safeview plus® (Diluido 1/10.000) y se corrió por 85 minutos a 80V.

Resultados

Detección de genes característicos de pESI en cepas de *S. Infantis*

Para determinar la presencia del plasmidio pESI en cepas de *S. Infantis*, se tomó una muestra representativa de las cepas que se estudiaron previamente. Se inició este estudio con 30 cepas que presentan 13 patrones diferentes de resistencia antimicrobiana fenotípica, descritos en la *Tabla N°1*. De éstos, el 73,3 % de las cepas son del año 2018 (22/30), 23,3 % son del 2017 (7/30) y 3,3% es del 2016 (1/30). En cuanto al origen de estas cepas: 15 se aislaron en la Región Metropolitana (RM), 14 en la VI región y 1 proviene de Inglaterra.

Se determinó la presencia de genes característicos del plasmidio pESI mediante la técnica de PCR convencional. Previamente, se había detectado la presencia de genes de resistencia asociados a pESI [26]. Para complementar este estudio, en el presente trabajo se incluyó la detección de *repB*, *merA*, *fyuA*, *traC-2* y *pilL*. Todos estos genes se detectaron en un 96,7% (29/30) de las cepas analizadas. Solo una cepa no presentó estos genes y corresponde a la cepa 23, proveniente de Inglaterra y que tiene como característica ser pansensible a los antibióticos estudiados por Romero (2019).

Detección del gen de resistencia antimicrobiana *fosA3*

De las 30 cepas, se conocía el patrón genotípico de multirresistencia antimicrobiana incluyendo los genes *aadA1*, *sull*, *tetA*, *floR*, *dfrA14* y *bla_{CTX-M}* grupo 9 (Romero C, 2019). En el presente estudio se determinó un séptimo gen de resistencia antimicrobiana *fosA3*, para el cual no se tiene información fenotípica, detectándose en un 37% (11/30) de las cepas.

Esta información permitió clasificar las cepas en base al nuevo patrón genotípico (*Tabla N° 5*). Se observan 8 patrones de resistencia antimicrobiana genotípica diferentes, de los cuales el que presenta mayor frecuencia se caracteriza por la presencia de *tetA*, *aadA1*, *floR*, *dfrA14*, *sull*, *bla_{CTX-M}* grupo 9, *fosA3*, en 7/30 cepas (23,3%), en tanto, el segundo patrón se compone de *tetA*, *aadA1*, *floR*, *dfrA14*, *sull* y está en 6/30 (20%).

Tabla N° 5: Patrones de resistencia antimicrobiana genotípica

| N° | CEPA | tetA | aadA1 | floR | dfrA14 | sulI | bla _{CTX-M} grupo 9 | fosA3 | % |
|----|-------------------|------|-------|------|--------|------|------------------------------|-------|----------------|
| 1 | S. Infantis – 27 | P | P | P | P | P | P | P | 23,3 (7/30) |
| 2 | S. Infantis – 28* | P | P | P | P | P | P | P | |
| 3 | S. Infantis – 29 | P | P | P | P | P | P | P | |
| 4 | S. Infantis – 41* | P | P | P | P | P | P | P | |
| 5 | S. Infantis – 51 | P | P | P | P | P | P | P | |
| 6 | S. Infantis – 67 | P | P | P | P | P | P | P | |
| 7 | S. Infantis – 71 | P | P | P | P | P | P | P | |
| 8 | S. Infantis – 26* | P | P | P | P | P | P | N | 13,3 (4/30) |
| 9 | S. Infantis – 36 | P | P | P | P | P | P | N | |
| 10 | S. Infantis – 38 | P | P | P | P | P | P | N | |
| 11 | S. Infantis – 76 | P | P | P | P | P | P | N | |
| 12 | S. Infantis – 2 | P | P | P | N | P | P | P | 10 (3/30) |
| 13 | S. Infantis – 33 | P | P | P | N | P | P | P | |
| 14 | S. Infantis – 34* | P | P | P | N | P | P | P | |
| 15 | S. Infantis – 49 | P | P | P | N | P | P | N | 6,7 |
| 16 | S. Infantis – 68 | P | P | P | N | P | P | N | (2/30) |
| 17 | S. Infantis – 1 | P | P | P | P | P | N | N | 20 (6/30) |
| 18 | S. Infantis – 8 | P | P | P | P | P | N | N | |
| 19 | S. Infantis – 9 | P | P | P | P | P | N | N | |
| 20 | S. Infantis – 13 | P | P | P | P | P | N | N | |
| 21 | S. Infantis – 42 | P | P | P | P | P | N | N | |
| 22 | S. Infantis – 70 | P | P | P | P | P | N | N | |
| 23 | S. Infantis – 19 | P | P | P | N | P | N | P | 3,3 (1/30) |
| 24 | S. Infantis – 37 | P | P | N | P | P | N | N | 6,7 |
| 25 | S. Infantis – 64 | P | P | N | P | P | N | N | (2/30) |
| 26 | S. Infantis – 7 | P | P | N | N | P | N | N | 13,3 (4/30) |
| 27 | S. Infantis – 44 | P | P | N | N | P | N | N | |
| 28 | S. Infantis – 48* | P | P | N | N | P | N | N | |
| 29 | S. Infantis – 72 | P | P | N | N | P | N | N | |
| 30 | S. Infantis – 23 | N | N | N | N | N | N | N | 3,3 (1/30) |

P Presencia del gen N Ausencia del gen

Las cepas marcadas con (*) son aquellas seleccionadas para los experimentos de conjugación

Extracción de plasmidio de alto peso molecular de pESI

Con el fin de confirmar la presencia del plasmidio pESI, cuyo tamaño es mayor a 300.000 pb, se hicieron extracciones de plasmidio, sin embargo, de los numerosos intentos en ninguno se logró

visualizar bandas representativas de plasmidios en las 5 cepas que se usaron a continuación como donantes en los experimentos de conjugación, aun cuando en las cepas control se lograba ver plasmidios de alto peso molecular, como se puede ver en la *Figura N°2*.

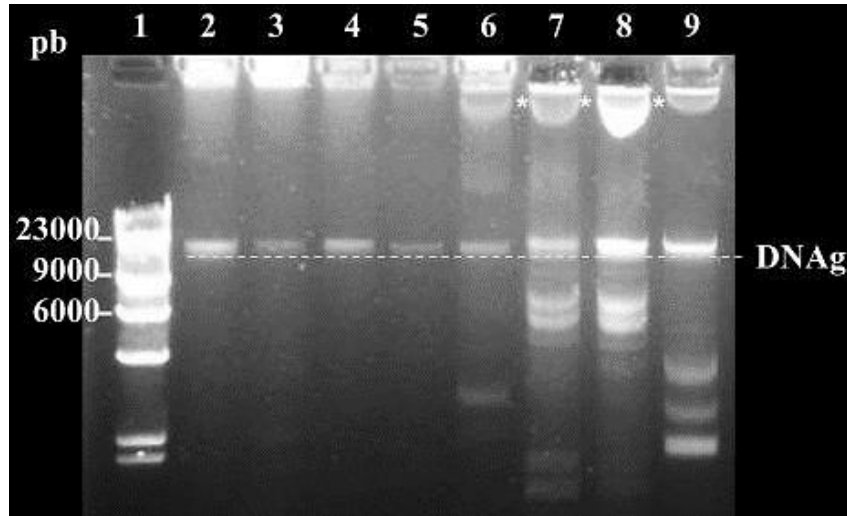


Figura N° 2. Ausencia de la visualización de pESI desde la extracción de plasmidial desde donantes *S. Infantis* cepas 28,34,41, y 48

DNAg: DNA genómico; (*): DNA de plasmidios de alto peso molecular

Carril 1: Ladder DNA λ hind III; carriles 2- 5: cepas donantes *S. Infantis* cepas: 28,34,41 y 48 respectivamente; carril 6: cepa transformada *S. Infantis* 23/pUC18K; carriles 7- 8: *Shigella sonnei* a0187 y a0214 respectivamente; carril 9: cepa *Shigella flexneri* 2457. Los últimos 3 carriles fueron usados como control de extracción.

Para determinar si la ausencia de bandas en las muestras obtenidas era producto de la ausencia real del plasmidio pESI en las extracciones o era efecto de la baja eficiencia del ensayo, se hizo la determinación del gen representativo *traC-2* usando las extracciones plasmidiales (*Figura N°2*) como templado para PCR. El resultado indicó la presencia del gen en todas las cepas donantes y fue negativo para las muestras de *Shigella*, sugiriendo que pESI estaría presente en la extracción, aunque no se pueda visualizar.

Ensayos de conjugación bacteriana

Para los experimentos de conjugación se seleccionaron las 5 cepas mencionadas anteriormente *S. Infantis* cepas 26, 28, 34, 41 y 48, que representan distintos patrones de resistencia antimicrobiana

fenotípica y genotípica, dentro de las cuales se incluyó las 3 cepas secuenciadas previamente (*S. Infantis* cepa 28, 34 y 48). El propósito inicial de estos ensayos contemplaba la transferencia del plasmidio hacia dos cepas receptoras, una *E. coli* y otra *Salmonella* spp. Por esta razón, fue necesario obtener una cepa de *Salmonella* con una resistencia antimicrobiana distinta que permitiera diferenciarla de la donante.

La receptora *Salmonella* spp. se obtuvo mediante transformación de la cepa 23 (pansensible a los antibióticos probados) con el plasmidio pUC18K que confiere resistencia a kanamicina y ampicilina. Se seleccionó la cepa transformante y se confirmó la adquisición del fenotipo de resistencia y del plasmidio mediante extracción y visualización en gel de agarosa (*Figura N° 3*).

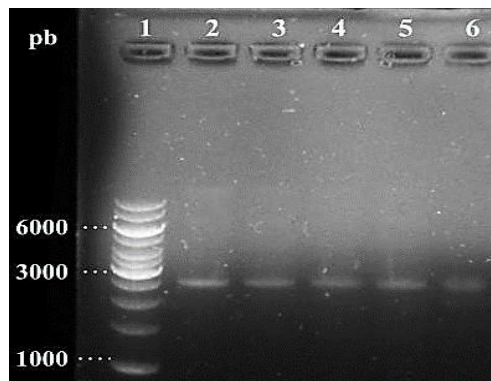


Figura N° 3. Confirmación de la transformación mediante la extracción de pUC18k en las cepas seleccionadas
Carril 1: Ladder 1kb; carriles 2-5: 4 colonias resultantes de la transformación; carril 6: Control positivo para el plasmidio pUC18k

Para determinar las condiciones de selección para las conjugaciones, se determinó la CIM en las cepas donantes y receptoras para azida de sodio, kanamicina y cloranfenicol. Este ensayo permitió observar que todas las cepas donantes son sensibles a azida de sodio a concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$, solo las cepas 34 y 48 son sensibles a 50 $\mu\text{g/mL}$ o más de kanamicina y la única cepa sensible a concentraciones mayores a 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol fue la cepa 48.

Se realizaron numerosos ensayos de conjugación usando los protocolos descritos en los Anexos N° 2, 3 y 4. En la mayoría de estos experimentos, tanto la donante como la receptora crecieron en las placas de selección, o pasadas las 48 horas de incubación no había crecimiento. Por otro lado, en aquellas

conjugaciones donde se usó como receptora *E. coli* UC231, las cepas que crecieron en la placa de selección no correspondieron a *E. coli* conjugantes, sino a mutantes espontáneas de las cepas de *S. Infantis* donantes. Esto se evidenció mediante PCR convencional, usando *invA* como marcador específico de *Salmonella* spp., donde todas las posibles conjugantes que se esperaba fueran *E. coli*, amplificaron el marcador específico de *Salmonella* (Figura N° 4).

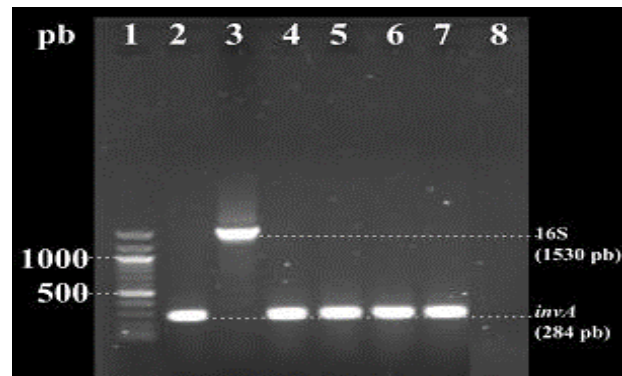


Figura N° 4. Descarte de conjugantes en ensayos entre *S. Infantis* cepa 26 y *E. coli* UC231 por la presencia del gen *invA*
Carril 1: Ladder 100 pb; carril 2: Cepa donante (*S. Infantis* cepa 26); carril 3: Cepa receptora (*E. coli* UC231); carriles 4-7: Posibles conjugantes; carril 8: Control negativo (sin templado).

Obtención de conjugantes *E. coli*

Mediante el protocolo descrito en detalle en materiales y métodos fue posible obtener conjugantes entre *Salmonella* y *E. coli*. Específicamente, usando como donante a *S. Infantis* cepa 28 y como receptora *E. coli* UC231 e incubando en ambiente microaerófilico durante el tiempo de conjugación, se logró obtener conjugantes en placas de selección de AL suplementadas con TET 10 µg/mL y N₃Na 150 µg/mL (Figura N°5).

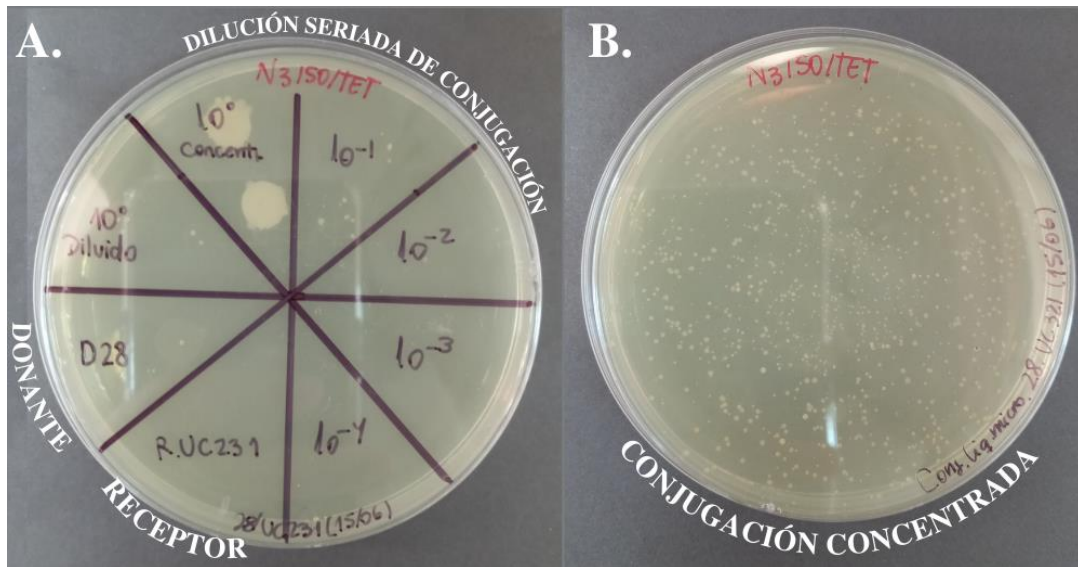


Figura N° 5. Selección de colonias conjugantes *S. Infantis* 28/*E.coli* UC231 en placas (TET 10µg/mL y N₃Na 150 µg/mL) donde se obtuvieron exitosamente conjugantes. (A) Imagen de primera placa de selección sembrada como se describe (B) Imagen de segunda placa de selección como se describe.

Se traspasaron colonias crecidas en las placas de selección a otras placas suplementadas con antibióticos y desde éstas se aislaron 5 colonias conjugantes: C12, C13, C17, C18 y C21. Se confirmó que estas cepas no eran *Salmonella* por la ausencia de producto de amplificación del gen *invA* mediante PCR convencional (Figura N° 6), y en paralelo se confirmó mediante MALDI TOF que estas colonias eran *E. coli* conjugantes.

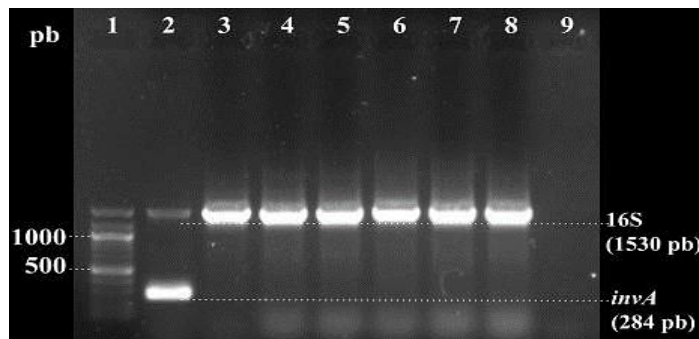


Figura N° 6. Ausencia del amplificado de *invA* en conjugantes *E. coli*
 Carril 1: Ladder de 100pb; carril 2: Cepa donante (*S. Infantis* cepa 28); carril 3: Cepa receptora (*E. coli* UC231); carriles 4-8: Conjugantes C12, C13, C17, C18, y C21 respectivamente; carril 9: Control negativo (sin templado).

Para confirmar la presencia del plasmidio pESI en las cepas conjugantes, se detectó mediante PCR convencional la presencia de 4 genes característicos de pESI (*repB*, *traC-2*, *fyuA* y *merA*) y la

presencia de 4 genes de resistencia antimicrobiana codificados en pESI: *fosA3*, *floR*, *bla_{CTX-M-9}* y *dfrA14* usando lisado bacteriano de estas cepas. Los resultados obtenidos se resumen en la *Tabla N°6*, que evidencia la identidad del patrón de genes de pESI detectado entre las cepas de *E. coli* conjugantes respecto al patrón esperado para la cepa parental de *S. Infantis* cepa 28.

Tabla N° 6: Resumen de resultados obtenidos por PCR convencional para confirmación de la presencia de genes en las conjugantes 12,13,17,18 y 21.

| | Género | | pESI | | | Genes de resistencia | | | | |
|-----------------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-----------------------------|--------------|-------------|------------------------------|---------------|
| | - | <i>invA</i> | <i>repB</i> | <i>traC-2</i> | <i>fyuA</i> | <i>merA</i> | <i>fosA3</i> | <i>floR</i> | <i>bla_{CTX-M-9}</i> | <i>dfrA14</i> |
| Donante: | | | | | | | | | | |
| S. Infantis 28 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Receptor: | | | | | | | | | | |
| E. coli UC231 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Conjugante 12 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Conjugante 13 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Conjugante 17 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Conjugante 18 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Conjugante 21 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

A estas cepas conjugantes también se les hizo extracción de plasmidio de alto peso molecular con el fin de ver si era posible visualizar el plasmidio en cepas de otro género. Efectivamente, a diferencia de las extracciones anteriores, se pudo ver un plasmidio que se repite en el mismo lugar en 4/5 de las conjugantes (12,13,17, y 18) (*Figura N°7*).

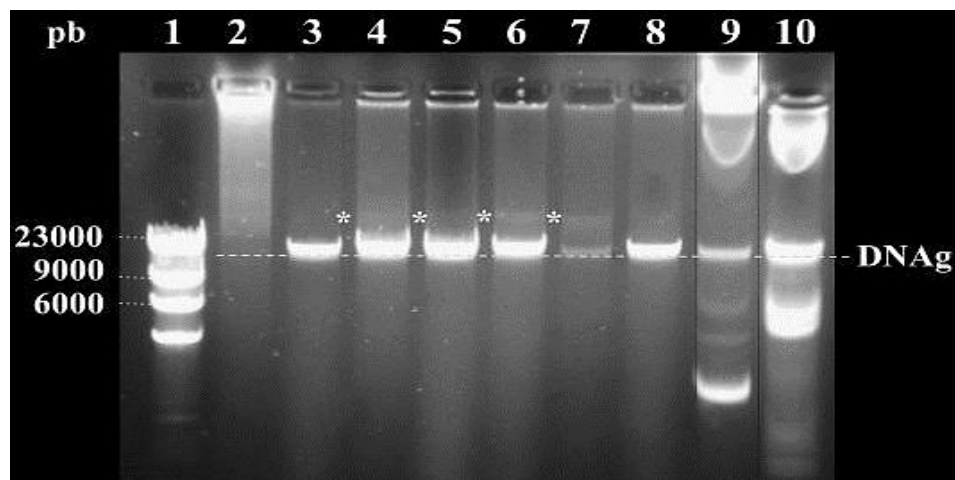


Figura N° 7. Presencia de plasmidio de mismo peso molecular en 4/5 conjugantes
DNAg: DNA genómico ; (*): DNA plasmidial de mismo peso molecular

Carril 1: Ladder DNA λ hind III; Carril 2: Donante (*S. Infantis* cepa 28); Carril 3: Receptora *E. coli* UC231; Carriles 4 - 8: Conjugantes 12,13,17,18 y 21 respectivamente; Carril 9: *S. Infantis* 23/pUC18k; Carril 10: *Shigella sonnei* 214.

Además, se hizo PCR convencional para los partidores *traC-2* e *invA* a estas extracciones plasmidiales (Figura N° 8). Así, se detectó la presencia del gen *traC* y la ausencia de *invA* en las muestras de plasmidio de las conjugantes, confirmando lo detectado en los lisados bacterianos de las conjugantes y la presencia de ambos marcadores en la cepa donante.

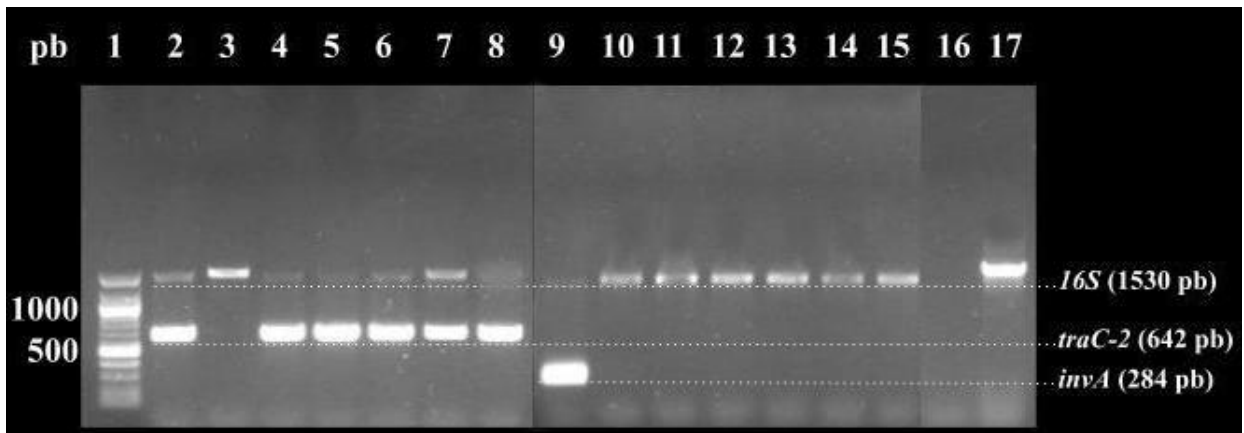


Figura N° 8: Detección de presencia del amplificado de *traC* y ausencia de *invA* en la extracción de las conjugantes

Carril 1: Ladder de 100pb; carril 2-8: amplificación del gen *traC-2*; carril 9-17 amplificación del gen *invA*. Carriles 2 y 9: donante (*S. Infantis* cepa 28); Carril 3 y 10: receptora (*E. coli* UC231); carriles 4 y 11: Conjugante 12; carriles 5 y 12: conjugante 13; carriles 6 y 13: conjugante 17; carriles 7 y 14: conjugante 18; carriles 8 y 15: conjugante 21; carril 16: Control negativo de la reacción; carril 17: Control negativo de *invA* – lisado de *Shigella sonnei* a0214.

Discusión

S. Infantis es un serovar emergente de trascendencia mundial y nacional, principalmente debido al progresivo aumento en la detección de cepas con multirresistencia antimicrobiana. Esta característica se asoció a la presencia del megaplasmidio denominado pESI que se detectó inicialmente en Israel [16] y que desde entonces se ha aislado y caracterizado mundialmente. En Chile, los principales estudios describen el mismo panorama en cepas aisladas desde planteles avícolas [28] y carnes de pollo [27]. Sin embargo, aun cuando se sugiere la presencia de este megaplasmidio, a la fecha no se ha demostrado su capacidad de conjugación.

El objetivo del presente estudio, que era determinar la presencia de este plasmidio conjugativo, se originó a partir de los resultados obtenidos inicialmente por Romero, 2019, que también apuntaban a la circulación de este plasmidio en cepas de *S. Infantis* aisladas en planteles avícolas. Por esta razón, se pudo secuenciar tres cepas representativas de distintos patrones genotípicos de multirresistencia a antibióticos (*S. Infantis* cepas 28, 34 y 48). El análisis bioinformático de estas secuencias permitió reconstituir el plasmidio y caracterizar el perfil pMLST [43], que fue idéntico para las tres cepas incI1 (*ardA*, *trbA*, *sogS* y *pilL*). Este perfil de genes ha sido ampliamente relacionado con pESI [9].

Para caracterizar el resto de las cepas no secuenciadas consideradas en el presente estudio, se analizó un grupo de genes específicos del plasmidio, entre ellos el grupo de incompatibilidad FIB mediante la amplificación del gen *repB*, detectado en las 29 cepas chilenas estudiadas. Este grupo ha sido descrito en Alemania [12], Inglaterra y Wales [44], Turquía [45], y EE. UU. [46]. Esta característica en pESI parece haber cambiado con el tiempo, ya que en los estudios iniciales era más común encontrar que pertenecía al grupo de incompatibilidad IncP o IncII (*Anexo N°1*). Este dato es de importancia principalmente debido a que esta clasificación repercute fuertemente en las características de replicación y transferencia de los plasmidios [25].

También se caracterizó la presencia de genes asociados a la virulencia bacteriana descritos en pESI, incluyendo *merA* como representante de operón de tolerancia a mercurio y *fyuA* que forma parte

del operón de yersiniabactina. Además, se incluyó en el estudio los genes *traC* y *pilL*, que son parte esencial en la formación del pili de secreción tipo IV, ambos regulados positivamente por condiciones ambientales, específicamente por ambientes de microaerobiosis y temperaturas fisiológicas [23]. Estos cuatro genes (*merA*, *fyuA*, *traC* y *pilL*) permiten determinar de manera global los componentes característicos de pESI y se detectaron en las 29 cepas chilenas estudiadas. Este resultado, junto a la detección del gen *repB* permiten confirmar la presencia del plasmidio pESI en Chile.

El principal componente de variabilidad entre estas cepas son los perfiles de resistencia antimicrobiana fenotípico y genotípico. El patrón de resistencia genotípico más prevalente de acuerdo con los resultados obtenidos en esta tesis incluye los genes *tetA*, *aadA1*, *floR*, *dfrA14*, *sull*, *bla CTX-M-9*, *fosA3*, que se describió en un 23% de las cepas estudiadas. Este perfil no es exclusivo de Chile, ya que el mismo patrón ha sido descrito en Inglaterra y Wales [44] y en EE. UU [46], lo que sugiere la diseminación intercontinental de este plasmidio y de las cepas que lo portan. En relación con la multirresistencia, se pudo detectar 8 patrones genotípicos distintos, de los cuales el perfil constituido solo por *tetA*, *aadA1* y *sull* estuvo presente en un 13% de las cepas, sin embargo, en conjunto con otros determinantes genéticos se encontró en las 29 cepas chilenas. Por lo tanto, la diversidad de pESI dado por la resistencia antimicrobiana probablemente seguirá modificándose en el tiempo, considerando que estos determinantes de resistencia están asociados a integrones y secuencias de inserción, que favorecen su movilidad.

Mediante el análisis bioinformático con ResFinder de las cepas secuenciadas se detectaron 2 genes de resistencia, *bla CTX-M-65* y *fosA3*, que no habían sido detectados previamente en el laboratorio. Los partidores usados por Romero (2019) eran específicos para cefalosporinas de tercera generación *bla CTX-M* del grupo 9, formado por al menos 20 genes distintos, dentro de los cuales se incluye a *bla CTX-M-65* [37]. Entonces, este análisis informático permite confirmar la presencia del gen *bla CTX-M-65*. Esto es relevante debido a que *bla CTX-M-65* ha sido detectado y asociado a pESI en Alemania [47], EE. UU [20], entre otros [9]. Más aún, McMillan et al. (2020) realizaron un estudio comparativo de las características de resistencia antimicrobiana entre los plasmidios descritos en *Salmonella 34ntérica*,

describiendo que el gen *bla*_{CTX-M-65} solo ha sido detectado en pESI de *S. Infantis*, confirmando la alta especificidad de esta asociación [30].

Mediante la integración de la información obtenida por la secuenciación y la detección de los genes característicos de pESI por PCR convencional, se logró confirmar la composición del plasmidio pESI presente en *S. Infantis* cepa 28 (Figura N°9), que es la cepa representante del grupo con más genes de resistencia asociados al plasmidio.

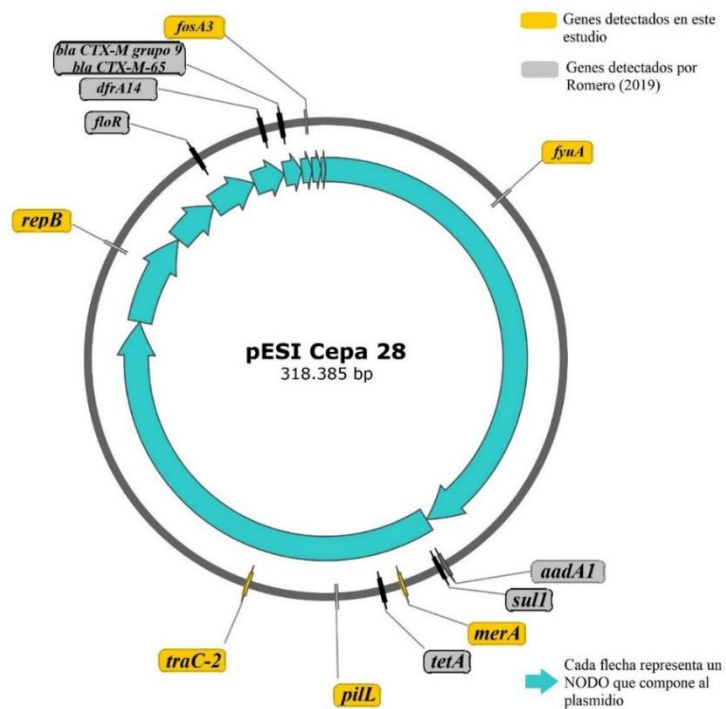


Figura N° 9: Composición de pESI de *S. Infantis* cepa 28 mediante SnapGene® software

Una segunda parte del trabajo de tesis se enfocó en la evaluación de la capacidad conjugativa del plasmidio pESI. Para ello, se analizó desde 3 perspectivas: la primera es la determinación de genes involucrados en la mantención y transferencia conjugativa, por este motivo se detectó los genes *pilL* y *traC-2*, que han sido descritos como elementos clave [9,23]. La presencia de ambos genes sugiere que las cepas estudiadas tienen la capacidad genética de conjugación.

La segunda perspectiva tiene relación con verificar el traspaso *in vitro* del plasmidio hacia otras cepas mediante conjugación, seleccionando la adquisición de características fenotípicas, específicamente de resistencia antimicrobiana. Luego de numerosos ensayos, se logró obtener conjugantes de *E. coli* que portan el plasmidio pESI a partir de la cepa donante 28, sin embargo, hubo 3 variables fundamentales que se modificaron para lograr finalmente este objetivo:

- La proporción de donante y receptora usada, ya que dentro de los experimentos descritos en otros estudios para la conjugación de pESI, todos usaban la proporción 1:1 [17, 23, 46]. Por esta razón, se usó esta proporción en los primeros protocolos. Pero se cambió a 1:10, que permitió obtener conjugantes, siguiendo el protocolo descrito por Wiesner et al, 2013, que lo utilizó para un plasmidio de baja frecuencia conjugativa. [48]
- La concentración de los marcadores de selección que suplementaban las placas. Teóricamente, la cepa *E. coli* UC231 crecía en concentraciones de hasta 300 µg/mL de azida de sodio, sin embargo, al usar estas concentraciones el crecimiento era lento, demorando hasta 48 horas para ver colonias, y si se disminuía a 100 µg/mL permitía el crecimiento de mutantes espontáneas de la cepa donante. En este contexto, se tiene el antecedente que por lo general la frecuencia de conjugación pESI por donante de 10^{-7} ~ [23], lo cual no difiere mucho de la frecuencia de aparición de una mutación espontánea que, por ejemplo, en *E. coli* se ha descrito una tasa de $0,15 \times 10^{-3}$ mutaciones por genoma por generación en genes de resistencia a rifampicina [49].
- Disponibilidad de O₂ durante la conjugación; éste fue el cambio clave para la obtención de conjugantes ya que, aunque la conjugación era posible en aerobiosis, de acuerdo con Aviv et al (2016), la frecuencia aumentaba si se hacía en condiciones de microaerobiosis. [23]

Finalmente, la tercera manera de evaluar la capacidad de conjugación es visualizar pESI en las extracciones de plasmidio de las conjugantes obtenidas. Para que esto tenga sentido es necesario también extraer a pESI desde *S. Infantis*, las donantes. Sin embargo, no fue posible visualizar pESI a pesar de detectar uno de los genes característicos (*traC-2*) desde las extracciones. Ante esto, se abren dos posibilidades: la primera, que las condiciones del gel para visualizar los resultados no eran las adecuadas

a pesar de que se hicieron modificaciones del *buffer* de corrida, concentración de agarosa, tiempo de corrida y el voltaje. La otra opción es que el plasmidio se haya integrado al DNA cromosomal, respecto a esto se ha descrito que plasmidios conjugativos de alto peso molecular puede imponer un costo energético y modificaciones metabólicas en la bacteria [50], por esta razón ciertos plasmidios pueden evolucionar y convertirse en un elemento integrativo y conjugativo (ICE) los cuales tienen la capacidad de integrarse al DNA cromosomal [51]. Si así fuera, no sería posible visualizar el plasmidio como una banda distinta en el gel, sin embargo, esto no ha sido descrito en otros estudios de pESI.

En este contexto, aún cuando la extracción plasmidial desde las conjugantes permitió visualizar una banda común, que podría corresponder a pESI, esto no se pudo confirmar. Las muestras de estas extracciones generaron un producto amplificado al usar los partidores de un gen característico de pESI (*traC*) y no se obtuvo amplificado para el gen *invA*. Sin embargo, esto no difiere de lo obtenido en la extracción plasmidial de las cepas donantes donde no fue posible visualizar una banda en el gel. Ante esta situación, la mejor opción para poder identificar la banda común entre las conjugantes del gel de la *figura N° 7* sería la realización de PCR directamente desde el DNA presente en la banda del gel. Considerando las limitaciones de tiempo, no fue posible hacerlo en este estudio.

Resumiendo los resultados obtenidos en esta investigación, se confirma la presencia de pESI en las cepas chilenas estudiadas y este plasmidio tiene los elementos genéticos necesario para conjugarse lo cual se probó mediante la obtención *in vitro* de conjugantes *E.coli* con las características fenotípicas y genotípicas de pESI.

Conclusiones

La aparición progresiva de la multirresistencia antimicrobiana en *Salmonella* Infantis a nivel mundial y nacional especialmente en planteles avícolas y fuentes animales, se asocia al megaplasmidio conjugativo pESI.

En el presente estudio, se puede confirmar que este elemento genético se encuentra circulando en las cepas chilenas aisladas en el periodo 2016 – 2018, ya que presentan los genes característicos de los diversos componentes comunes presentes en pESI (*repB*, *merA*, *fyuA*, *traC-2*, *pilL*).

La variabilidad de las cepas chilenas de *S. Infantis* se asocia a los perfiles de resistencia antimicrobiana genotípica, sugiriendo que por lo menos hay 8 pESI estructuralmente diferentes.

Este plasmidio posee la capacidad conjugativa en cepas chilenas, debido a que presenta los genes clave para la formación de la maquinaria genéticamente compleja involucrada en la conjugación.

Finalmente, se logró obtener conjugantes en *E.coli* a las que se les confirmó la adquisición de las características fenotípicas y genotípicas de la cepa parental.

Este estudio caracteriza cepas de *S. Infantis* multirresistentes a antibióticos que circulan en planteles avícolas. Estos antecedentes permiten hacer un llamado de alerta sobre el futuro de la aparición de estas cepas en ambientes clínicos diseminadas por los alimentos contaminados. La vigilancia de estos nuevos aislados podría cambiar lo que ya conocemos de pESI en Chile.

Referencias bibliográficas

- 1) Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B, Franco CM, Cepeda A. “A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*”. *Microbiological Research*. [Internet]. 2018; 206: 60–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- 2) Instituto de Salud Pública (ISP). “Boletín de vigilancia de laboratorio: *Salmonella* spp. 2014-2018”. [Internet]. 2019; 6 (13): 1 – 15. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnSalmonella-12052020A.pdf>
- 3) European Food Safety Authority (EFSA) y European Center for Disease Prevention and Control (ESDC). “The European Union one health 2020 zoonoses report”. *European Food Safety Authority Journal*. [Internet]. 2021; 19(12): 37–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- 4) Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. “*Salmonella enterica*: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile”. *Revista Chilena de Infectología*. [Internet]. 2016; 33(5): 547-557. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- 5) Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. “Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy”. *Pediatrics & Neonatology* [Internet]. 2013; 54(3): 147-152. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>
- 6) Medalla F, Gu W, Mahon BE, Judd M, Folster J, Griffin PM, Hoekstra RM. “Estimated incidence of antimicrobial drug-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections, United States, 2004-2012”. *Emerging Infectious Diseases*. [Internet]. 2016; 23(1): 29–37. Disponible en: <https://doi.org/10.3201/eid2301.160771>
- 7) - A. Lee CM, Lee MS, Yang TL, Lee KL, Yen TY, Lu CY, Chang LY. “Clinical features and risk factors associated with bacteremia of nontyphoidal salmonellosis in pediatric patients, 2010–2018”. *Journal of the Formosan Medical Association*. [Internet]. 2021; 120(1): 196-203. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.04.022>
- 8) Tack DM, Ray L, Griffin PM, Cieslak PR, Dunn J, Rissman T, et al. “Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases

- Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2016-2019”. *Morbidity and Mortality Weekly report (MMWR)*. [Internet]. 2020; 69(17):509–514. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6917a1>
- 9) Bogomazova AN, Gordeeva VD, Krylova EV, Soltynskaya IV, Davydova EE, Ivanova OE, et al. “Mega-plasmid found worldwide confers multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* Infantis of broiler origin in Russia”. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 2020; 319(108497): 108497. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108497>
 - 10) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “National enteric disease surveillance: salmonella annual report”. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*. [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>.
 - 11) Cohen E, Rahav G, & Gal-Mor O. “Genome sequence of an emerging *Salmonella enterica* serovar Infantis and genomic comparison with other *S. Infantis* strains”. *Genome Biology and Evolution* [Internet]. 2020; 12(3): 223-228. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa048>
 - 12) García-Soto S, Abdel-Glil MY, Tomaso H, Linde J, Methner U.” Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis of multilocus sequence type 2283 in German broiler farms”. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020; 11: 1741. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01741>
 - 13) Hindermann D, Gopinath G, Chase H, Negrete F, Althaus D, Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M. “*Salmonella enterica* serovar Infantis from food and human infections, Switzerland, 2010–2015: poultry-related multidrug resistant clones and an emerging ESBL producing clonal lineage”. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2017; 8: 1322. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01322>
 - 14) Kumar Y, Singh V, Kumar G, Gupta NK., Tahlan, AK.”Serovar diversity of *Salmonella* among poultry”. *The Indian Journal of Medical Research* [Internet]. 2019; 150(1): 92–95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6798603/>

- 15) Ministerios de Salud (MINSAL). “BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO TRIMESTRAL: Brotes enfermedades transmitidas por alimentos S1-52” [Internet]. 2019. Disponible en: http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/02/BET_ETA_2019.pdf
- 16) Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, Gal-Mor O. “A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain”. *Environmental Microbiology* [Internet]. 2014; 16(4): 977-994. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12351>
- 17) Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, Battisti A. “Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011 and 2014”. *PloS One* [Internet]. 2015; 10(12): e0144802. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144802>
- 18) Szmolka A, Wami H, Dobrindt U. “Comparative genomics of emerging lineages and mobile resistomes of contemporary broiler strains of *Salmonella* Infantis and *E. coli*”. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2021; 12: 342. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642125>
- 19) Yokoyama E, Ando N, Ohta T, Kanada A, Shiwa Y, Ishige T, Murakami S. “A novel subpopulation of *Salmonella enterica* serovar Infantis strains isolated from broiler chicken organs other than the gastrointestinal tract”. *Veterinary Microbiology* [Internet]. 2015; 175(2-4): 312-318. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.024>
- 20) – A. McMillan EA, Wasilenko JL, Tagg KA, Chen JC, Simmons M, Gupta SK, Frye JG. “Carriage and gene content variability of the pESI-like plasmid associated with *Salmonella* Infantis recently established in United States poultry production”. *Genes* [Internet]. 2020; 11(12): 1516. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/genes11121516>
- 21) Iriarte A, Giner-Lamia J, Silva C, Betancor L, Astocondor L, Cestero JJ, García-del Portillo F. “Draft genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strain SPE101, isolated from a chronic human infection”. *Genome Announcements* [Internet]. 2017; 5(29): e00679-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00679-17>

- 22) Alba P, Leekitcharoenphon P, Carfora V, Amoruso R, Cordaro G, Di Matteo P, Engage-Eurl-Ar Network Study Group. “Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid”. *Microbial Genomics* [Internet], 2020; 6(5). Disponible en: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000365>
- 23) Aviv G, Rahav G, Gal-Mor O.” Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar Infantis resistance and virulence plasmid pESI to the gut microbiota of warm-blooded hosts”. *MBio* [Internet] 2016; 7(5): e01395-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mBio.01395-16>
- 24) Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Hordijk J. “Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2018; 73(5): 1121-1137. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- 25) Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. “Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance”. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2018; 31(4): e00088-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- 26) Romero CF. “Caracterización de cepas de *Salmonella* Infantis aisladas de planteles avícolas: Análisis de relación clonal y resistencia a antibióticos”. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2019 55p
- 27) Lapierre L, Cornejo J, Zavala, Galarce N, Sánchez F, Benavides MB, et al. “Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors and susceptibility to antibiotics in *Salmonella* Infantis strains isolated from chicken meat: First findings in Chile”. *Animals* [Internet]. 2020; 10(6): 1049. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani10061049>
- 28) Pardo-Esté C, Lorca D, Castro-Severyn J, Krüger G, Alvarez-Thon L, Zepeda P, Sulbaran-Bracho Y, Hidalgo A, Tello M, Molina F, Molina L, Remonsellez F, Castro-Nallar E, Saavedra C. “Genetic characterization of *Salmonella* Infantis with multiple drug resistance profiles isolated from a poultry-farm in Chile”. *Microorganisms* [Internet]. 2021; 9(11): 2370. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112370>

- 29) Toro C, Salazar J, Romero C, Pineda G, Quiroz T, Vidal R, et al. Presencia del plásmido pESI-like en cepas chilenas de *Salmonella enterica* Infantis. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM 2021); Paraguay; 2021
- 30) B. McMillan EA, Jackson CR, Frye JG. “Transferable plasmids of *Salmonella enterica* associated with antibiotic resistance genes”. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020; 2497. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562181>
- 31) Besser JM. “*Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change”. *Food Microbiology*. [Internet]. 2018; 71: 55–59. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>
- 32) Che Y, Yang Y, Xu X, Břinda K, Polz MF, Hanage WP, Zhang T. “Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2021; 118(6): e2008731118. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.2008731118>
- 33) Khajanchi BK, Kaldhone PR, Foley SL. “Protocols of conjugative plasmid transfer in *Salmonella*: Plate, broth, and filter mating approaches”. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2019; 2016:129–139. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9570-7_12
- 34) Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. “Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2010; 65(12): 2518-2529. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq347>
- 35) Zechner EL, Lang S, Schildbach JF. “Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* [Internet]. 2012; 367(1592): 1073–1087. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0207>
- 36) Sakai D, Komano T. “Genes required for plasmid R64 thin-pilus biogenesis: identification and localization of products of the *pilK*, *pilM*, *pilO*, *pilP*, *pilR*, and *pilT* genes”. *Journal of Bacteriology* [Internet]. 2002; 184(2): 444-451. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.444-451.2002>

- 37) D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. "CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance". *International Journal of Medical Microbiology* [Internet]. 2013; 303(6-7), 305-317. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
- 38) Lv L, Huang X, Wang J, Huang Y, Gao X, Liu Y, et al. "Multiple plasmid vectors mediate the spread of *fosA3* in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacterales isolates from retail vegetables in China". *Msphere* [Internet]. 2020; 5(4): e00507-20. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00507-20>
- 39) Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. "Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2010 65(3):490-5. Disponible en: <https://academic.oup.com/jac/article/65/3/490/748889?login=false>
- 40) Miranda A, Ávila B, Díaz P, Rivas L, Bravo K, Astudillo J, Bueno C, Ulloa MT, Hermosilla G, Del Canto F, Salazar JC, Toro CS. (2016). "Emergence of plasmid-borne *dfrA14* trimethoprim resistance gene in *Shigella sonnei*". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2016; 6: 77. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00077>
- 41) Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE., Ginocchio, C., et al. "Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*". *Molecular and Cellular Probes* [Internet]. 1992; 6(4): 271–279. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
- 42) Silva C, Betancor L, García C, Astocondor L, Hinostroza N, Bisio J, et al. "Characterization of *Salmonella enterica* isolates causing bacteremia in Lima, Peru, using multiple typing methods". *PloS One* [Internet]. 2017; 12(12): e0189946. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189946>
- 43) Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. "Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications". *Wellcome Open Research* [Internet]. 2018; 24(3):124. Disponible en: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

- 44) – B. Lee WW, Mattock J, Greig DR, Langridge GC, Baker D, Bloomfield S, Nair S. “Characterization of a pESI-like plasmid and analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* Infantis isolates in England and Wales”. *Microbial Genomics* [Internet]. 2021; 7(10): 000658. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000658>
- 45) Kürekci C, Sahin S, Iwan E, Kwit R, Bomba A, Wasyl D. “Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid”. *International Journal of Food Microbiology* [Internet]. 2021; 337: 108956. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- 46) Tate H, Folster JP, Hsu CH, Chen J, Hoffmann M, Li C, Zhao S. (2017). “Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2017; 61(7): e00488-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>
- 47) Pietsch M, Simon S, Meinen A, Trost E, Banerji S, Pfeifer Y, Flieger A.” Third generation cephalosporin resistance in clinical non-typhoidal *Salmonella enterica* in Germany and emergence of bla CTX-M-harboring pESI plasmids “. *Microbial Genomics* [Internet]. 2021; 7(10). Disponible en: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000698>
- 48) Wiesner M, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Zavala-Alvarado C, Zaidi MB, Calva E, Silva C. “Conjugative transfer of an IncA/C plasmid-borne blaCMY-2 gene through genetic re-arrangements with an IncX1 plasmid”. *BMC Microbiology* [Internet]. 2013; 13(1): 1-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-264>
- 49) Williams AB. “Spontaneous mutation rates come into focus in *Escherichia coli*”. *DNA Repair* [Internet]. 2014; 24: 73–79. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.09.009>
- 50) Vial L, Hommais F. “Plasmid-chromosome cross-talks”. *Environmental Microbiology* [Internet]. 2020; 22(2): 540-556. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14880>

51) Botelho J, Schulenburg H. “The role of integrative and conjugative elements in antibiotic resistance evolution”. *Trends in Microbiology* [Internet]. 2021; 29(1): 8-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>

Anexos

Anexo N° 1: Tabla resumen de los grupos de incompatibilidad descrito en las investigaciones y estudios hasta la fecha sobre las características y demás implicados en el plasmidio pESI en *S. Infantis*

| País | Año | Grupo de incompatibilidad | Referencia |
|-----------------------|-------------|---|-------------------|
| Italia | 2011 - 2013 | pESI es el resultado de la recombinación entre IncI1 y IncP | [17] |
| Israel | 2014 | <i>“pESI es un plásmido quimérico que implica la combinación entre IncI1 y IncP - 1α”</i> | [16] |
| Israel | 2016 | <i>“La región de transferencia es similar a la del plásmido Inc I R64”</i> | [23] |
| Suecia | 2017 | Inc FII y IncI1, entre otros. | [13] |
| Rusia | 2020 | IncI II | [9] |
| Estados Unidos | 2020 | Genes involucrados en IncI 1 con el replicón de Inc P | [20] |
| Alemania | 2020 | IncI1 y IncF en diversas cepas de <i>S. Infantis</i> aisladas de muestras obtenidas de centros avícolas. | [12] |
| Europa | 2020 | IncP replicon de origen con genes de IncI1 | [22] |
| Chile | 2020 | IncFIB | [29] |
| Hungría | 2021 | IncI y elementos de IncX | [18] |

Anexo N° 2: Variaciones del primer protocolo de conjugación tratado en este estudio

| N° | DONANTE/RECEPTOR | | SUBCULTIVO | | CONJUGACIÓN | | | SELECCIÓN |
|----|----------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|-------------------|-------|-----------------------|--|
| | Donante | Receptor | Dilución | Tiempo y temperatura | Proporción (D: R) | Medio | Tiempo y temperatura | |
| 1 | <i>S. Infantis</i> cepa 28 | <i>E. coli</i> UC231 | 1/20 | 4 horas en agitación 37°C | 1:1 | LB | 6 horas a 37°C | Agar Luria N3(300 µg/mL) y TET (10 µg/mL µg/mL) |
| 2 | <i>S. Infantis</i> cepa 28 | <i>S. Infantis</i> cepa 23/pUC18k | 1/20 | 4 horas en agitación 37°C | 1:1 | LB | 18 horas a 37°C (o.n) | Agar Luria TET (10 µg/mL µg/mL) y KAN (50 µg/mL µg/mL) |
| 3 | <i>S. Infantis</i> cepa 28 | <i>E. coli</i> UC231 | 1/20 | 4 horas en agitación 37°C | 1:1 | LB | 18 horas a 37°C | Agar Luria N3 (200 µg/mL µg/mL) y TET (10 µg/mL µg/mL) |
| 4 | <i>S. Infantis</i> cepa 34 | <i>E. coli</i> UC231 | 1/20 | 4 horas en agitación 37°C | 1:1 | LB | 18 horas a 37°C | Agar Luria N3 (200 µg/mL µg/mL) y TET (10 µg/mL µg/mL) |
| 5 | <i>S. Infantis</i> cepa 34 | <i>E. coli</i> UC231 | 1/10 | 1 hora en agitación 37°C | 1:1 | LB | 7 horas a 37°C | Agar SS N3 (200 µg/mL µg/mL) y TET (10 µg/mL µg/mL) |
| 6 | <i>S. Infantis</i> cepa 34 | <i>S. Infantis</i> cepa 23/pUC18k | 1/10 | 1 hora en agitación 37°C | 1:1 | LB | 6 horas a 37°C | Agar Luria TET (10 µg/mL µg/mL) y KAN (50 µg/mL µg/mL) |
| 7 | <i>S. Infantis</i> cepa 48 | <i>S. Infantis</i> cepa 23/pUC18k | 1/10 | 1 hora en agitación 37°C | 1:1 | LB | 5 horas a 37°C | Agar Luria TET (10 µg/mL µg/mL) y KAN (50 µg/mL µg/mL) |
| 8 | <i>S. Infantis</i> cepa 34 | <i>S. Infantis</i> cepa 23/pUC18k | 1/10 | 1 hora en agitación 37°C | 1:1 | LB | 5 horas a 37°C | Agar Luria KAN (50 µg/mL µg/mL) y CM (50 µg/mL) |
| 9 | <i>S. Infantis</i> cepa 34 | <i>E. coli</i> UC231 | Se lavó y dejó incubar en agitación por 1 hora | | 1:1 | LB | 5 horas a 37°C | Agar SS CM (50 µg/mL) y N3 (100 µg/mL) |
| 10 | <i>S. Infantis</i> cepa 26 | <i>E. coli</i> UC231 | Se lavó y dejó incubar en agitación por 1 hora | | 1:1 | LB | 5 horas a 37°C | Agar SS CM (50 µg/mL) y N3 (100 µg/mL) |

(LB): Caldo Luria, (on.): overnight, (N3): Azida de Sodio (NaN₃), (KAN): Kanamicina, (TET): Tetraciclina, (CM): Cloranfenicol

Anexo N° 3: Variaciones del segundo protocolo de conjugación tratado en este estudio

| N° | DONANTE/RECEPTOR | | CONJUGACIÓN | | | SELECCIÓN |
|----|----------------------------|----------------------|------------------|-------|----------------------|---|
| | Donante | Receptor | Proporción (D:R) | Medio | Tiempo y temperatura | |
| 1 | <i>S. Infantis</i> cepa 28 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | AL | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |
| 2 | <i>S. Infantis</i> cepa 26 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | AL | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |
| 3 | <i>S. Infantis</i> cepa 41 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | AL | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |

A.L: Agar Luria, (D:R): (donante:receptor), (*on.*): overnight, (N3): Azida de Sodio (NaN₃), (TET): Tetraciclina

Anexo N° 4: Variaciones del tercer protocolo de conjugación tratado en este estudio

| N° | DONANTE | RECEPTOR | CONJUGACIÓN | | | | SELECCIÓN |
|----|----------------------------|----------------------|------------------|-------------|----------------------------------|----------------------|---|
| | | | Proporción (D:R) | Medio | Disponibilidad de O ₂ | Tiempo y temperatura | |
| 1 | <i>S. Infantis</i> Cepa 34 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | Agar Luria | Microaerobiosis | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |
| 2 | <i>S. Infantis</i> Cepa 34 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | Caldo Luria | Microaerobiosis | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |
| 3 | <i>S. Infantis</i> Cepa 26 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | Agar Luria | Microaerobiosis | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10 µg/mL) |
| 4 | <i>S. Infantis</i> Cepa 28 | <i>E. coli</i> UC231 | 1:10 | Caldo Luria | Microaerobiosis | <i>on.</i> a 37°C | Agar Luria N3(150 µg/mL) y TET (10µg/mL) |

A.L: Agar Luria, (D:R): (donante:receptor), (*on.*): overnight, (N3): Azida de Sodio (NaN₃), (TET): Tetraciclina

