



“Clasificación de plásmidos por relaxasas”

Memoria para la obtención del Título de Doctor
por la Universidad de Cantabria

Andrés Alvarado García
Santander, 8 de febrero, 2016

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria, entre los años 2006 y 2011. Durante este tiempo, el autor de este trabajo estuvo contratado como Técnico de Apoyo a la Investigación, gracias a un proyecto financiado por IDICAN (2007-2010) y, posteriormente, por la propia Universidad de Cantabria (septiembre-diciembre, 2011).

Para mis chicas

El que es perfecto no se manifiesta

(Pessoa)

Las páginas de agradecimientos son las más complicadas, sobre todo cuando han pasado tantos años desde que empezó aquello por lo que has de dar gracias. Quiero empezar por agradecerle a Fernando de la Cruz la oportunidad de trabajar junto a él y su equipo. Me permitió conocer a mucha gente fantástica, con la que me he divertido, trabajado y sufrido. Carlos, Raúl, Dani, Blanca, Carolina, María, Mati, Sandra, Elena, Iñaki, Gabi, los clásicos, los primeros que conocí. Os tengo que agradecer mucho la manera en que me acogisteis, me enseñasteis y cómo me habéis acompañada durante todo este tiempo. Inma, Yera, Peña, Lillo, David, Jorge, Juanxo, Val, Eric, los que vinisteis después. Fuisteis unos fantásticos compañeros de despacho. Nos lo hemos pasado como los indios contando batallitas y hemos currado como leones entre las cuatro paredes de la Lobera. Sin todos vosotros, mi carácter no sería el que es ahora.

He de tener un agradecimiento especial para Mapi. Muchas gracias por tu guía experta, sin ella, no podría haber llegado hasta aquí. Muchas gracias por tu infinita sabiduría, que ha hecho de luz en el camino. Muchas gracias por la inmensa paciencia que has tenido a la hora de educar a alguien como yo.

Hay otras personas del mundillo de la ciencia que han sido figuras importantes para mí en estos años. Creo que les puedo llamar amigos, igual que a los anteriores y creo que he de mencionarlos aquí. Lorena, Esther, Manu, Belén, Caterina, Cathy, Tere Coque, Vicky. Todos vosotros, todos juntos, hicisteis que levantarse un día tras otro para ir a amplificar genes y apuntar plásmidos, mereciera la pena. De verdad.

Esto no sería una página de agradecimientos completa sin unas frases para los míos. Todos ellos creyeron siempre en que este día llegaría. Han sufrido conmigo (en ocasiones, incluso más que yo) y comparten ahora la alegría de este final. A todos ellos, a mi familia (la biológica y la adoptada, ya sabéis quiénes sois) quiero transmitir mi más sentido agradecimiento por todo este tiempo, por todo lo que habéis sido, sois y seréis para mí.

Por último, tengo que agradecerle todo el sacrificio, toda la paciencia, toda la compañía y el apoyo de todos estos años a mi mujer. Aia, eres la luz de mis ojos, no hay nadie como tú en este mundo. Sin ti, mi vida no tiene Norte. Esta Tesis es en gran parte tuya y absolutamente para ti.

Y me despido con un beso para ti Alia, hija mía, que te esperará aquí hasta el día que tu curiosidad te conduzca a estas páginas. Se feliz.

ABREVIATURAS

Ác. Aspártico	Asp
Ác. Glutámico	Glu
Ácido desoxiribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
ADN de cadena doble	ADNcd
ADN de cadena sencilla	ADNcs
Amplio espectro de huésped	BHR
ARN interferente	ARNi
ARN mensajero	ARNm
Clasificación de plásmidos por MLST	pMLST
Clasificación de replicones por PCR	PBRT
Clasificación por multi <i>locus</i> ST	MLST
<i>Consensus-Degenerated Hybrid Oligonucleotide Primer</i>	CODEHOP
Elementos integrativos cromosómicos	EICs
Histidina	His
Incompatibilidad	Inc
Kilobase	kb
Medio Luria-Bertani	LB
Megabase	Mb
Módulo de control	REG
Módulo de estabilidad	STB
Módulo de establecimiento	EST
Módulo de formación del par conjugativo	MPF
Módulo de movilización	MOB
Módulo de replicación	REP
Módulo variable	VAG
Origen de replicación	<i>oriV</i>
Origen de transferencia	<i>oriT</i>
Par de bases	pb
Proteína acopladora	T4CP
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Replicación por círculo rodante	RCR
Sistema de secreción tipo IV	T4SS
Tipo de secuencia	ST
Tirosina	Tyr
Toxina/antitoxina	TA
Transferencia genética horizontal	TGH

ÍNDICE

- Sección 1: Introducción
 - Plásmidos: organización y características generales p.2
 - La clasificación de los plásmidos p.9
- Objetivos
- Sección 2: Materiales y Métodos
 - 2.1.Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos p.18
 - 2.2.Protocolos de uso común p.19
 - 2.3.Herramientas informáticas p.24
 - 2.4.Cebadores degenerados para identificar familias MOB (DPMT) p.25
 - 2.5.Array en suspensión p.28
 - 2.6.Colecciones de aislados p.32
 - 2.7.Secuenciación completa de plásmidos y relaxasas p.34
- Sección 3: Resultados
 - 3.1.Validación del método DPMT p.42
 - 3.2.Identificación de relaxasas por medio del array en suspensión p.56
 - 3.3.Diversidad de las relaxasas en distintas colecciones de aislados bacterianos p.58
 - 3.4.Análisis de las cepas sin relaxasa detectable p.70
 - 3.5.Aislados con relaxasa MOB p.82
- Sección 4: Discusión
 - 4.1.Clasificación según replicón frente a clasificación según relaxasa p.99
 - 4.2.Análisis de los plásmidos secuenciados p.103
- Sección 5: Conclusiones p.110
- Bibliografía p.112

SECCIÓN 1: INTRODUCCIÓN

Sección 1

Plásmidos: organización y características generales

Los Procariotas (tanto Archaea como Bacteria) contienen una diversidad genética inmensa, que les ha permitido moldear la biosfera terrestre durante los últimos 3,8 miles de millones de años, adaptarse a las condiciones cambiantes del medio ambiente y, en consecuencia, colonizar cualquier nicho ecológico disponible. Su evolución, la modificación de su genoma en última instancia, depende de los mecanismos clásicos descritos para todos los organismos conocidos (i.e., la mutación directa de la secuencia, el intercambio de genes producido al dejar descendencia, etc.). Esta dependencia, sin embargo, es menor que la que tienen los organismos que cuentan con un modo de reproducción sexual. Los Procariotas modifican sus genomas no tanto por la transferencia vertical de los mismos como por mecanismos de transferencia horizontal. Esto les permite adquirir genes para adaptarse de manera inmediata a las exigencias puntuales de un nicho ecológico concreto. Cabe citar como ejemplo paradigmático de estos mecanismos, la adquisición de genes de resistencia frente a los antibióticos en los ámbitos hospitalarios [3].

Existen tres mecanismos principales de transferencia genética horizontal (TGH): transformación natural, transducción y conjugación. La transformación es la capacidad que tienen las células procariotas competentes para adquirir fragmentos de ADN libre, presente de manera abundante en los suelos, las aguas (dulces o saladas), los sedimentos marinos y otros ambientes habitados por Procariotas. La persistencia del ADN abarca desde los días a los años [19]. En general, la incorporación de estos fragmentos de ADN es independiente de la secuencia, aunque existen microorganismos (e.g. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*) en los que existe un reconocimiento de cortas secuencias de nucleótidos, distribuidas a lo largo del ADN cromosomal. Esto conlleva el sesgo en la incorporación de nuevo material genético hacia el ADN de la propia especie presente en el medio [20].

La transducción es la incorporación de material genético a una bacteria receptora, mediado por la infección de un virus bacteriófago (o fago) atemperado. Tras la infección de la célula bacteriana, el ADN del fago se integra en el cromosoma bacteriano, bien en puntos específicos, bien aleatoriamente, dependiendo del tipo de fago. Esto se denomina conversión lisogénica. El material integrado, denominado profago, es transmitido verticalmente a la descendencia de la bacteria receptora hasta que se induce el comienzo del ciclo lítico. En él, el genoma del fago se escinde del cromosoma y se empaqueta en la envuelta típica del fago en cuestión, siendo liberado al medio por medio de la lisis de la bacteria huésped. En este proceso, el material genético adyacente al profago puede resultar escindido con este, empaquetado y liberado con el resto de fagos recién ensamblados. Este material cromosómico quedará integrado en el cromosoma del próximo receptor que resulte infectado por este fago. Inmediatamente se puede deducir que, entre otros muchos genes, este mecanismo puede servir para la expansión de resistencias a antibióticos de origen cromosómico [21]. Algunos ejemplos de esto incluyen la transducción de genes de resistencia a ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina entre cepas de *Salmonella typhimurium* DT104 [22], la transferencia del gen de resistencia a cefalosporinas *bla_{CMY-2}* y de los genes de resistencia a tetraciclinas *tet(A)* y *tet(B)* entre cepas de *Salmonella* multirresistentes y susceptibles, así como la presencia de fagos inducibles en el 75% de las *Salmonella* multirresistentes (frente al 53% de las no resistentes) [23].

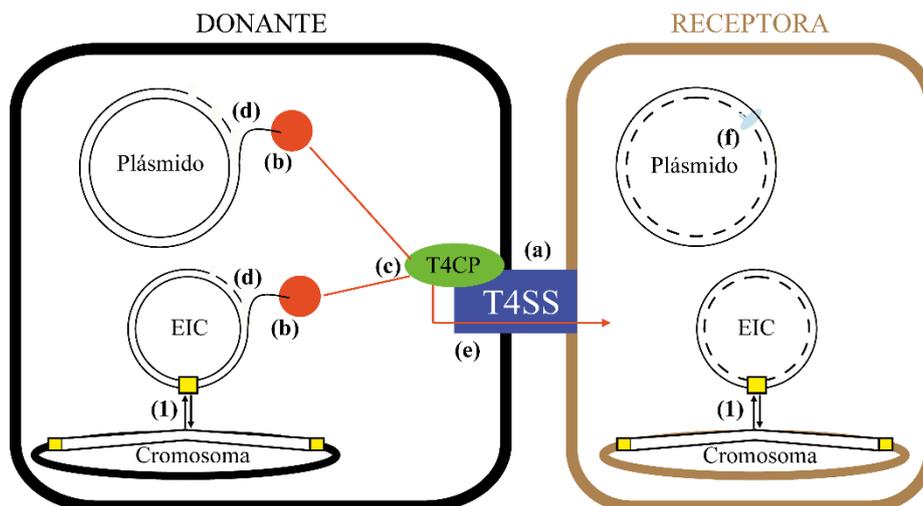


Figura 1.A. Esquema de los principales sucesos que ocurren durante la conjugación. En la imagen, (a) una célula donante (izquierda) que contiene un plásmido y un elemento integrativo conjugativo (EIC), en estado escindido (1) ha entrado en contacto con una célula receptora vacía (derecha) a través de la parte extracelular del T4SS. (b) En la célula donante, las relaxasas (círculo rojo) reconocen la secuencia de corte de su *oriT*, se unen a ella (en algunos casos, con el concurso de algunas proteínas accesorias) y cortan una de las cadenas por la acción de la Tyr catalítica de su centro activo. La hebra de ADN y la relaxasa permanecen covalentemente unidas a través de la Tyr catalítica hasta el final del proceso de conjugación. (c) El complejo formado entra en contacto con la proteína acopladora (T4CP), y por intermediación suya, con el sistema de secreción tipo IV (T4SS). (d) Mientras esto ocurre, partiendo desde el extremo 3'-OH libre del sitio *nic*, comienza una ronda de replicación tipo círculo rodante que completará el plásmido en el recipiente original. (e) Se ha propuesto que la T4CP es la encargada de bombear el complejo ADN-relaxasa hacia la célula receptora. El transporte hace uso de la estructura transmembrana del T4SS. (f) Una vez en la célula receptora el plásmido transcribirá sus genes, bien partiendo de ssADN, bien pasando primero a dsADN, dependiendo del tipo de plásmido. (g) Como último paso, la cadena sencilla transferida del plásmidos es recircularizada por medio, de nuevo, de la acción de la Tyr catalítica, mientras que el EIC se integra en el cromosoma (1). El par conjugativo se separa a continuación, por causa de la exclusión de entrada.

La conjugación es el proceso mediante el cual la información genética, transportada por un plásmido o un elemento integrado en el cromosoma (EIC) bacteriano, pasa de su célula recipiente original (denominada donante) a una receptora que antes no lo contenía (figura 1.A.). Tanto plásmidos como EICs se clasifican en conjugativos y movilizables (en cuanto a TGH se refiere). Elementos conjugativos son aquellos capaces de conjugarse por sí mismos, sin el concurso de proteínas codificadas en otros plásmidos, EICs o cromosomas. Elementos movilizables son aquellas moléculas que requieren que alguno de los elementos descritos en la figura 1.A. actúe en *trans*. Hasta fechas bastante recientes, se aceptaba que los plásmidos eran los elementos más abundantes involucrados en la conjugación bacteriana. Sin embargo, el estudio de más de mil genomas bacterianos secuenciados, ha demostrado que esta asunción era incorrecta, pues los EICs sobrepasan con creces el número de plásmidos en las bases de datos [24].

Los plásmidos tienen tres características esenciales, a saber, primero, son capaces de replicarse de manera autónoma (por lo que se pueden mantener en el citoplasma celular por sí mismos), segundo, tienen capacidad para transmitirse horizontalmente (de manera autónoma o siendo movilizados) y tercero, son desechables, desde el momento en que no cargan genes indispensables para su huésped. Los EICs no son capaces de replicarse a sí mismos, aunque existen algunas excepciones [25, 26] y por tanto no se consideran plásmidos [27].

Los plásmidos son moléculas de ADN circular covalentemente cerrado y super-enrollado, que se mantienen independientes del cromosoma bacteriano gracias a su capacidad auto-replicativa [27, 28], aunque existen plásmidos lineales [29]. Su tamaño y contenido varía enormemente debido a la superposición de eventos de TGH. Esta diversidad hace que podamos encontrar desde plásmidos con un único gen, de apenas una kilobase (kb) de longitud, hasta mega-plásmidos (>1 Megabase), que pueden ser considerados cromosomas secundarios para la célula huésped, por contener genes esenciales para la célula huésped [27].

Sección 1

Por norma general, se acepta que los plásmidos están organizados de manera modular, dado que los genes con funciones semejantes suelen aparecer físicamente agrupados en la hebra de ADN [27, 30-32]. Las funciones que acabamos de definir como propias de los plásmidos son las que determinan los módulos que le son indispensables y que forman su chasis genético: replicación (independencia), estabilidad, establecimiento (mantenimiento) y propagación (conjugación) [3]. Los genes que no se relacionan con estas funciones pueden ser considerados como módulos accesorios y generalmente codifican fenotipos que benefician al huésped (e.g. genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, de degradación de xenobióticos, etc.).

Módulo de replicación. Este módulo (denominado comúnmente replicón) determina el número de copias de un plásmido. Esto es esencial, dado que a mayor número de copias disponibles, mayor probabilidad de ser replicado de nuevo (mejores perspectivas al competir con otros plásmidos). A la vez, el número de copias elevado tiene un coste metabólico para la célula, con lo que su exceso puede resultar pernicioso para la persistencia del plásmido a largo plazo [33, 34]. Pueden darse casos en los que un plásmido inestable persista en una población bacteriana en expansión por el simple hecho de replicarse sin ningún control [35, 36]. Por otra parte, la mayoría de los replicones se atenúan al entrar en una célula huésped vacía, acoplándose al ritmo de su ciclo celular con rapidez [37].

Existen tres mecanismos principales de replicación para los plásmidos: replicación θ , círculo rodante y desplazamiento de cadena [38]. La replicación θ ha sido estudiada principalmente en los plásmidos de las bacterias gram-negativas [3], pero también es un mecanismo conocido en plásmidos nativos de otros organismos (e.g. *Lactobacillus* [39, 40]). El mecanismo general de replicación tipo θ implica la apertura de la doble cadena parental, sobre la que se sintetizará un fragmento cebador de ARN (pARN) y que será extendido covalentemente para comenzar la replicación de la cadena complementaria. La síntesis de las cadenas hijas ocurre de manera continua (en la cadena adelantada) o discontinua (en la cadena retrasada), pero, en general, de manera acoplada. Se puede iniciar en uno o varios puntos de la doble cadena y puede ser uni- o bi-direccional. La gran mayoría de estos replicones precisan del concurso de una proteína iniciadora de la replicación, Rep y, en algunos casos, de la ADN polimerasa I de la célula huésped (en las fases iniciales de la síntesis de la hebra adelantada) [38]. La proteína Rep interactúa con una serie de repeticiones directas, denominadas iterones. Los iterones varían en número, posición en el genoma plasmídico y conservación de su secuencia, pero son esenciales para el control de la replicación del plásmido [38, 41-43] y de su número de copias totales, por el mecanismo denominado *handcuffing* [44, 45].

La replicación por círculo rodante (RCR) es la más común entre los plásmidos de bacterias gram-positivas, aunque existen ejemplos de este mecanismo entre las *Proteobacteria* [46]. El mecanismo general de actuación es asimétrico, pues la síntesis de las dos hebras está desacoplada. La cadena positiva del plásmido es nickada por la proteína Rep codificada por el plásmido. El corte se produce en el sitio denominado origen de doble cadena (*dso*). En el extremo 3'-OH generado se produce la síntesis de la hebra hija, con el concurso de factores celulares (e.g. ADN polimerasa III, Ssb y una helicasa, al menos) por desplazamiento de cadena. La síntesis termina cuando el replisoma alcanza de nuevo el *dso* y se produce una reacción de transferencia de cadena, que separa el producto sintetizado de la cadena desplazada. El producto final es un plásmido de cadena doble, compuesta por la hebra molde y la hebra recién sintetizada. La hebra parental desplazada durante la síntesis es reconvertida a forma de doble cadena por la maquinaria replicativa bacteriana (a partir de su propio origen de replicación, el origen de cadena sencilla, o *ssO*). Ambas copias del plásmido serán posteriormente súper-enrolladas por las girasas bacterianas [38].

Sección 1

La replicación por desplazamiento de cadena es propia de los plásmidos del grupo de incompatibilidad Q (IncQ) y de su modelo, el plásmido RSF1010. El replicón IncQ consta de tres proteínas, RepA (helicasa), RepB (primasa) y RepC (proteína de unión específica a ADN), su correspondiente sitio de unión (en *cis*) dentro del origen de replicación (*oriV*), al menos tres iterones idénticos de 20-22 pb (a los que se une RepC) y dos regiones palindrómicas (*ssiA* y *ssiB*) en posiciones opuestas de la cadena (a las que se une RepB) [38, 47]. Entre ambos juegos de repeticiones hay una región rica en G+C (28 pb) seguida de otra rica en A+T (31 pb).

La acción combinada de las tres proteínas Rep del replicón IncQ permiten a estos plásmidos replicarse independientemente de la maquinaria replicativa de la bacteria huésped. Tras la unión de RepC a sus iterones, la helicasa RepA se une a ambas cadenas de ADN en las proximidades del sitio de unión de RepC. Entonces, RepA se desplaza en sentido 5'→3' sobre la cadena L del plásmido, lo que separa la doble cadena, expone y activa los sitios *ssi*, a partir de los cuales procede la replicación, bidireccionalmente y de manera independiente. La acción de la helicasa RepA permite desplazar el ADN parental no replicado mientras la replicación va avanzando. Al final de la replicación pueden aparecer varios productos. Primero, cadenas sencillas de ADN circular covalentemente cerrado. Corresponden a las cadenas desplazadas durante la replicación, que contienen cualquiera de los sitios *ssi* y que serán usados como punto de inicio para la síntesis de su cadena complementaria y su conversión de moléculas de doble cadena. Segundo, moléculas de ADN de doble cadena, súper-enrollado por la actividad de la helicasa. Tercero, cualquier estadio intermedio, como círculos con solo una parte de su secuencia de doble cadena [38].

El control de la replicación autónoma de los plásmidos conlleva la aparición de los fenómenos de incompatibilidad entre plásmidos con mecanismos altamente relacionados. Esta característica ha sido históricamente utilizada para la clasificación de los plásmidos en grupos de incompatibilidad, que describiremos en detalle más adelante.

Módulo de estabilidad. Los plásmidos consiguen mantenerse de manera estable en los linajes bacterianos en los que se introducido por medio de tres mecanismos, ninguno de los cuales es universales (y por tanto, su valor para establecer relaciones entre los plásmidos es reducido): mecanismos de resolución de multímeros, sistemas de partición activa y sistemas de adicción molecular (o toxina/antitoxina; TA). Los mecanismos de resolución de multímeros se encuentran en los plásmidos con replicación tipo θ , para poder resolver el producto de la replicación de manera adecuada. También son necesarios para la resolución de los multímeros que aparecen por causa de la recombinación entre las copias del plásmido. Muchos plásmidos multicopia contienen únicamente un sitio llamado *cer*, en el que una resolvasa de la célula huésped actúa, convirtiendo el multímero en monómero [48, 49]. La ausencia de este sistema hace que aparezcan multímeros de orden cada vez mayor, que son más inestables, con lo que eventualmente se perderán (hipótesis de la catástrofe del dímero) [50].

Sección 1

Aunque los plásmidos de tamaño grande (por encima de 30 kb) pueden poseer sistemas de resolución de multímeros (e.g. el plásmido IncP1a RK2), al tener un bajo número de copias, por el reparto aleatorio de copias durante la división celular, aparecerán linajes de bacterias que hayan perdido el plásmido por azar (células “curadas”). Por tanto, precisan de los otros dos mecanismos para asegurarse, si no pasar a la descendencia (sistemas de partición activa), sí eliminar las células en las que no haya una copia del plásmido (sistemas TA). Los sistemas de partición activa se organizan mayoritariamente en un único *loci*, denominado *par*, que consta de tres elementos: una NTPasa (típicamente *parA/parM/tubZ*), una proteína que interactúa con el ADN (*parB/parR/tubR*), que se une al centrómero del plásmido (el tercer elemento del *loci*; *parS/parC*). Los sistemas más comunes de partición se clasifican en tres tipos, diferenciados por la clase de ATPasa de que disponen [15, 18].

El tipo I contiene ATPasas tipo Walker [51], relacionada con las proteínas de segregación cromosómica Soj y con las de división celular MinD [52, 53]. Tiene dos categorías, según su organización y el tamaño de sus componentes. En primer lugar, el tipo Ia (típico del plásmido F) contiene la secuencia *sopC* aguas abajo de *sopB*, mientras que el grupo Ib presenta su centrómero en posición aguas arriba de *parA* y *parB* (figura 1.B.). SopA mantiene el control sobre la transcripción del operón *par*, uniéndose a su operador, aguas arriba de su posición. Esta actividad es potenciada por la interacción con SopB. En el caso del plásmido F, el mismo centrómero *sopC* es necesario para que la represión de la actividad del operón sea máxima [15].

El tipo II de *loci* contiene ATPasas de tipo actina y se organiza como el *locus* del plásmido R1. La región centromérica (*parC*) contiene el promotor del operón y se encuentra aguas arriba de los genes *parM* (ATPasa tipo actina) y *parR* (interacción con el ADN). La actividad del promotor contenido en *parC* es controlada por la unión de ParR a su secuencia y, al contrario que en el tipo I, es independiente de la presencia de ParM [15]. El ADN, en estado súper-enrollado, envuelve el dímero funcional de ParR (aunque también se pueden encontrar interacciones de ambas moléculas en estado de ADN lineal) y, en este estado, producen el incremento de la actividad ATPasa de ParM. Esta actividad es necesaria para localizar ParM en los polos celulares y para proporcionar energía al proceso de partición plasmídica durante la división celular [15].

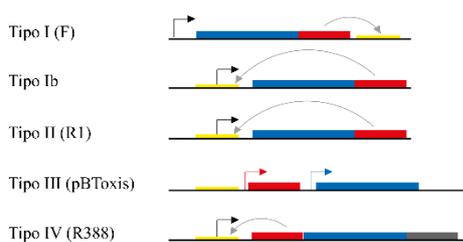


Figura 1.B. Organización de los distintos tipos de locus *par*. Modificado de [15] y [18]. EN la figura se muestran los elementos típicos que forman estos *loci*, descritos en el texto. Los segmentos amarillos indican el sitio del centrómero plasmídico. Los rectángulos azules señalan los motores dependientes de NTP y los rojos indican los elementos de interacción con el ADN. Las flechas negras indican los promotores del operón cuando éste posee un único controlador de su expresión. Las flechas roja y azul del tipo III indica el promotor de cada uno de los genes del sistema descrito. Las flechas grises indican los lugares de unión al ADN de los factores correspondientes. El rectángulo gris del sistema tipo IV señala al gen *stbC*, cuya presencia/ausencia no tiene efectos en la estabilidad de R388.

El tipo III, descrito en el plásmido pBToxis [54] contiene una GTPasa, semejante a una tubulina (*tubZ*). Su organización altera el orden visto en los dos *loci* anteriores, de manera que la GTPasa es precedida por la proteína de unión a ADN (*tubR*). El centrómero los precede a ambos. Ambos genes cuentan con su propio promotor, pero los niveles de ambos son regulados por la acción de TubR [54].

Un posible cuarto tipo de mecanismo de partición ha sido descrito en el plásmido R388 [18]. El operón *stbABC*, adyacente al origen de transferencia del plásmido, *oriT*, tiene un papel importante tanto en la estabilidad como en la conjugación. Primero, el operón se organiza aproximadamente como en el caso del tipo III de sistema de partición.

Sección 1

Precediendo al operón hay una serie de repeticiones directas que funcionan como sitio de unión para *StbA* [18], que contiene el promotor del operón y que sería asimilado al centrómero de los casos anteriores. Las evidencias empíricas indican que *StbA* controla la distribución normal de las copias del plásmido R388 a lo largo de la bacteria, encontrándose las copias del mismo agrupadas cuando el gen *stbA* es eliminado de la secuencia. La eliminación de *stbB* no afecta la estabilidad del plásmido, pero acaba con la conjugación. Esto se relaciona con que las copias de R388 aparecen distribuidas por toda la célula, excepto por sus polos (donde tendría lugar la conjugación) [18].

Por último, los sistemas TA tienen por finalidad eliminar la potencial competencia ecológica de las poblaciones bacterianas que han perdido el plásmido en cuestión. Esta eliminación pasa por utilizar un sistema dual, compuesto de una molécula estable, que detiene el crecimiento celular o, directamente, elimina la célula. El segundo compuesto sería una molécula inestable, que contrarresta la acción de la primera, pero que necesita de la secuencia codificante para mantener una cantidad suficiente en el citoplasma celular. Cuando una célula hija ha perdido el plásmido presente en la célula parental, aun recibe el complejo toxina-antitoxina. La antitoxina se irá degradando y desapareciendo de la célula hija, dejando libre a la toxina para que actúe.

En general, los genes TA se organizan precediendo la antitoxina a la toxina, solapándose y estando regulada su transcripción por ambas proteínas [55]. También hay ejemplos en los que este orden se encuentra invertido, el control del operón lo ejerce solo la antitoxina o incluso casos en los que interviene una tercera molécula [15, 56, 57].

Los sistemas TA se clasifican en dos grupos, dependiendo de la naturaleza de la antitoxina que utilicen. El tipo I de sistemas utiliza como antitoxina un ARN antisentido, que impide la traducción del ARNm de la toxina al secuestrarlo hibridándose con él. El tipo II de sistemas TA tiene como antitoxina un producto proteico que se une con elevada afinidad a la toxina. El sistema de tipo I más estudiado es el sistema *hok/sok*, del plásmido R1, de *E. coli*. En él, el gen *hok* produce un transcrito que no puede ser traducido y que es incapaz de unirse al ARN de *sok* debido a su estructura secundaria. Este estado es revertido al ser procesado su extremo 3', lo que permite tanto la traducción del ARNm de *hok* como su unión irreversible al ARNm de *sok*. Este dúplex de ARN es degradado mediante un proceso dependiente de una ARNasaIII. La proteína Hok actúa despolarizando la membrana bacteriana, de una manera similar a como actúan las holinas de los fagos antes de la lisis celular del ciclo lítico [58].

Los sistemas de tipo II son los más abundantes entre los plásmidos [55]. Consisten en una toxina proteica que es secuestrada por una antitoxina. Sin embargo, ésta es continuamente degradada por la acción de las proteasas de la célula huésped, de manera que ha de ser continuamente repuesta. La pérdida del plásmido durante la división celular implica que no se va a poder cubrir la necesidad de más antitoxina, con lo que la toxina queda libre para actuar sobre su(s) diana(s). Los sistemas TA tipo II se dividen en nueve familias, en función de la homología de las secuencias de aminoácidos de las toxinas [59]. Sus dianas pasan por causar la interrupción de la traducción al degradar el ARNm como endorribonucleasas o actuar sobre los ribosomas activos, por impedir la replicación al romper la doble cadena de ADN, actuando sobre la DNA girasa, etc [60]

Módulo de establecimiento. Los plásmidos conjugativos mantienen en su chasis genético una serie de genes orientados a gestionar las transacciones de ADN en las células recipientes. Esta región del genoma es esencial para su supervivencia en el medio natural, fuera de las condiciones del laboratorio. Se localiza en la llamada región líder del plásmido, que es la primera en introducirse en la célula huésped durante la

conjugación y codifica, entre otras, proteínas de unión a ADN de cadena sencilla o sistemas de antirestricción. El gen *sog* presente en los plásmidos del grupo de replicación I1, no es indispensable para la conjugación del plásmido entre células de *Escherichia coli*, pero es requerido para que estos plásmidos puedan expandir su rango de huésped hacia *Salmonella* y otras enterobacterias [61, 62]. Otro ejemplo es el gen *ardA*, presente en los plásmidos de los grupos de replicación N, Frep o I1. La proteína ArdA actúa específicamente contra los enzimas de restricción tipo I, protegiendo de este modo el ADN no protegido que entra en una célula receptora en la conjugación de los plásmidos de los mencionados grupos [63, 64]. Otros genes actúan sobre la respuesta SOS de la célula. Es el caso de los genes *psiB* y *ssb*, que son inducidos a continuación de la conjugación y ayudan al establecimiento del plásmido. PsiB inhibe la respuesta SOS derivada de la presencia de ssADN tras la conjugación uniéndose a RecA e inactivándola [65-67]. Mientras, Ssb se une a ssADN, reduciendo la respuesta SOS celular [68-70].

Módulo de conjugación. Según su capacidad de transferencia horizontal, los plásmidos (y los EICs) se clasifican, como ya hemos dicho, en conjugativos y movilizables. Los primeros poseen la maquinaria proteica completa que les permite transmitirse ellos mismos desde una célula donante a una receptora (figura 1.A.). La segunda categoría de plásmidos comprende a todos aquellos plásmidos (y EICs) que poseen solo una parte de dicha maquinaria y necesitan ser complementados por un elemento conjugativo para ser transferidos. La maquinaria y los elementos de secuencia necesarios para que un plásmido sea conjugativo incluyen un origen de transferencia (*oriT*), una relaxasa, una proteína acopladora

(T4CP) y un sistema de secreción tipo IV (T4SS). Los plásmidos movilizables carecen de un T4SS (completo). Pero únicamente la relaxasa es el componente proteico común a todos los plásmidos (y los EICs), conjugativos o movilizables.

La relaxasa está implicada en el inicio y final del proceso, promoviendo el corte de la cadena que va a ser transferida, tras reconocerlo, en un punto concreto de la secuencia del *oriT*. Tras el corte de la hebra, ésta queda unida covalentemente al residuo Tyr, permitiendo el traslado de la cadena sencilla de ADN generada a la célula receptora, por medio del acarreo de la relaxasa [71, 72]. Una vez en la célula receptora, la relaxasa catalizará la reacción de re-circularización de la cadena transferida [72, 73]. Todo el proceso descrito implica necesariamente el contacto físico del T4SS y la relaxasa, lo que ocurre a través de T4CP [74, 75]. Al contrario de lo que ocurre con la replicación de los plásmidos y las proteínas iniciadoras de la misma, la conjugación y las relaxasas se basan en un único mecanismo y una sola familia de proteínas, denominada 3H [2]. Esto ha permitido el desarrollo de la nomenclatura MOB (por *mobilization*) [1, 2, 73] (tabla suplementaria 1).

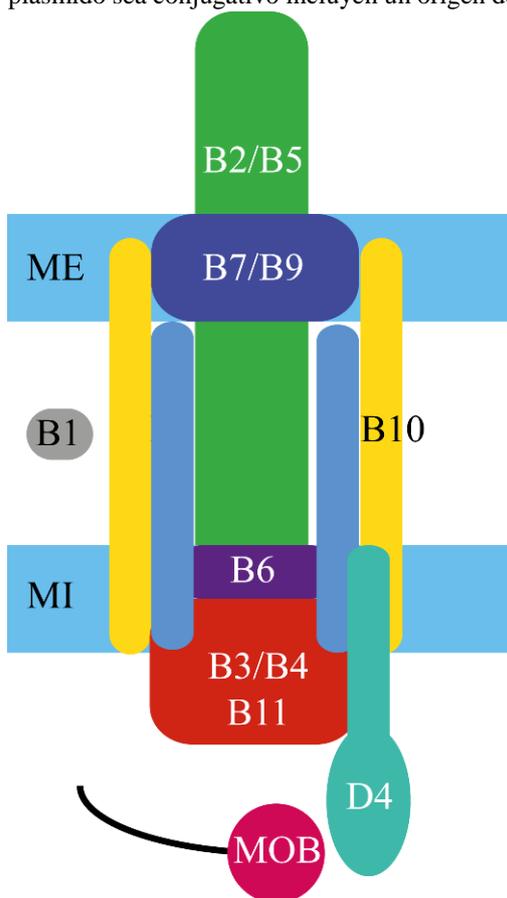


Figura 1.C. Organización del T4SS de *A. tumefaciens*. La secuencia de ensamblado y la función de todas las proteínas representadas en esta figura se detallan en el texto. Cada una de las VirB del sistema se representa solo por la denominación BX en esta figura. Es decir, B4 corresponde con VirB4 en el texto. También aparece el complejo ADNcs-relaxasa (MOB). Modificado de [17].

El T4SS de los plásmidos y EICs está formado por entre 12 y 30 genes, que se agrupan en un módulo discreto, denominado MPF (por *mating pair formation*) [73]. Se piensa que en la mayoría de los casos, la maquinaria del T4SS está implicada en la conjugación [76], pero se conocen casos en el que el sistema está especializado en exportar proteínas efectoras al citosol eucariótico, casos que aúnan estas dos funciones, casos de importación de ADN libre (el sistema ComB de *Helicobacter pylori*) o de secreción, asociada al fenómeno de la transformación natural [76-80]

El T4SS más conocido es el sistema de transferencia de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, denominado sistema *virB* y que sirve como modelo [81, 82]. Se trata de un macro-complejo multiproteico, que abarca la membrana interna, el espacio intermembrana, la membrana externa bacteriana y se proyecta hacia el exterior celular (figura 1.C.). El complejo central del T4SS, el primero en ensamblarse, se encuentra en el espacio intermembranas y se incluye en las membranas interna y externa. Las proteínas VirB7, VirB9 y VirB10 son sus componentes y juntas forman el canal de secreción del T4SS.

VirB10 forma la cara interna de este canal/cámara, así como el anillo inferior (membrana interna) del complejo. Además, abarca la longitud completa del complejo. VirB9 forma el recubrimiento exterior del complejo, el cual es estabilizado por la acción de VirB7, una lipoproteína [81, 83]. VirB3, VirB6 y VirB8 se unen a este complejo por la parte de la membrana interna, donde forman un poro [84]. VirB6 es una proteína politépica, con dominios transmembrana y un lazo periplásmico grande [85]. VirB3 no tiene un papel claro, aunque sea esencial para la formación del *pilus* y la translocación del sustrato. En algunos sistemas aparece fusionada a VirB4, sugiriendo una fuerte relación entre el papel funcional de ambas [86]. Al complejo así ensamblado se unen tres AAA+ ATPasas, VirB4, VirB11 y la T4CP, de las que VirB4 se encarga de proporcionar energía a la síntesis del *pilus*, formado por las pilinas mayor (VirB2) y menor (VirB5) [87]. Por último, VirB1 es una transglucosilasa no esencial, que degrada el peptidoglicano de la pared bacteriana, facilitando el ensamblaje del T4SS [88, 89].

De manera análoga a lo que ocurre con la relaxasa, en MPF encontramos un único gen con carácter universal para todos los T4SS (*i.e.* todos ellos tienen un elemento de esta clase), que codifica para VirB4 [73, 79]. La búsqueda de homólogos de esta proteína en las bases de datos y el análisis filogenético de los resultados, ha permitido definir ocho familias de MPF [17], estando únicamente cuatro de ellas involucradas en la conjugación en Proteobacteria (y *taxa* relacionados): los sistemas tipo VirB son los más numerosos (se denominan MPF_T); el sistema del plásmido F (IncFI) da nombre al MPF más común entre las γ -Proteobacterias (MPF_F), mientras que el definido por el plásmido R64 (IncI1) es infrecuente (MPF_I); por último, el sistema de la isla de patogenicidad ICEHin1056 representa los MPF mayoritariamente de islas de patogenicidad (EICs; se denomina MPF_G).

La clasificación de los plásmidos

El estudio de los plásmidos bacterianos es una disciplina de interés desde el momento en que las bacterias tienen la capacidad de adquirir y propagar genes de resistencia a antibióticos a través suyo. Para estudiar estos elementos, lo primero es clasificarlos de acuerdo a alguna característica fundamental. Los primeros estudios sobre plásmidos los distribuyeron en categorías en función de su capacidad para coexistir en una misma célula huésped. En esencia, se observa la desaparición, en ausencia de presión selectiva alguna, de un plásmido residente en una célula huésped, por competencia con un plásmido de nueva introducción [90]. Este rasgo se denomina incompatibilidad (Inc) y es un reflejo fenotípico de las

interacciones entre los mecanismos de replicación o partición [91, 92]. Teóricamente, implica que los mecanismos que intervienen en el proceso que desata la incompatibilidad son semejantes, de modo que se pueden utilizar sus componentes como descriptores de la relación evolutiva entre los plásmidos considerados. Este sistema de clasificación establece 27 grupos Inc distintos, con algunas subdivisiones posteriores [90, 93].

Sin embargo, el uso de estos elementos como indicadores de identidad o divergencia evolutiva, aunque de gran utilidad, tiene diferentes problemas, entre los que cabe destacar las siguientes: primero, los plásmidos multi-replicón, como F o R6K, entre otros [94, 95] producen equívocos en la clasificación; segundo, las diferencias en las frecuencias de segregación de las copias hacia las células hijas tras la mitosis pueden llevar a resultados confusos [96, 97]; tercero, los eventos de recombinación espontánea entre plásmidos de diferentes grupos Inc pueden producir cointegrados que lleven a confusión [98]; cuarto, una única mutación puntual puede conducir a la compatibilidad de plásmidos, por otra parte, idénticos [95, 99-103]; quinto, y a la inversa, plásmidos no homólogos pueden resultar incompatibles [94, 103-105]; sexto, la progresión exponencial en el número de plásmidos conocidos añade una gran carga a las técnicas y metodologías de la clasificación por incompatibilidad; séptimo, el carácter críptico de muchos plásmidos impide distinguirlos en experimentos de incompatibilidad; y octavo, no todos los plásmidos replican en los mismos huéspedes.

Todos estos problemas técnicos llevaron a adoptar un enfoque molecular en la determinación del grupo Inc. El primer método estaba basado en la hibridación de la región que determinaba la incompatibilidad con una sonda diseñada a tal efecto [106]. Estas sondas podían por tanto incluir tanto los replicones como las regiones implicadas en el control de la partición de hasta 19 grupos Inc distintos. Aunque solventaba la mayor parte de los problemas propios de la determinación de grupos por incompatibilidad para los plásmidos de enterobacterias, la hibridación aun impedía el procesamiento de grandes cantidades de muestras en un tiempo y con unos gastos razonables. Por tanto, se desarrolló el método de clasificación del replicón basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PBRT por sus siglas anglosajonas. Inicialmente se utilizó para la clasificación de grupos Inc de plásmidos de amplio espectro de huésped (BHR) en muestras de origen ambiental (grupos IncW, IncP1, IncQ1, IncN [5, 9, 107] y IncP9 [6, 7] y, más adelante, para clasificar replicones predominantes en Enterobacteriaceae [8, 10, 11, 108] y 19 grupos de plásmidos de resistencia en *Acinetobacter baumannii* [12]. Igualmente, se desarrollaron métodos de clasificación basados en los métodos de amplificación multiplex, empleados para determinar el tipo de secuencia (ST) en bacterias (*i.e.* MLST, que para plásmidos se denomina pMLTS). En general, estos cebadores de la PCR se desarrollaron para aquellos grupos Inc que habían demostrado estar compuestos por más de dos subgrupos [11, 109-112], añadiendo diversidad a la clasificación Inc. Los genes amplificados no tenían por qué estar relacionados con la replicación. A pesar de eliminar los principales problemas derivados de los métodos anteriores, PBRT y los otros métodos moleculares descritos son solo una aproximación experimental más sencilla para clasificar los plásmidos en grupos ya conocidos. Esto deja fuera del objetivo la diversidad existente fuera de estos grupos.

Aproximadamente, la mitad de los plásmidos y EICs conocidos son sésiles (*i.e.* no transmisibles por conjugación; figura 1.D.) y el resto son conjugativos o movilizables por medio de un plásmido conjugativo, a partes iguales [2, 73]. Los plásmidos conjugativos codifican en sus secuencias todas las

funciones que necesitan para llevar a cabo el proceso completo y los movilizables codifican solo una parte de estas secuencias, como ya hemos visto. Sin T4SS, estos plásmidos precisan usar el de un plásmido conjugativo para transferirse. Así, la proteína que resulta común a todo este catálogo de plásmidos móviles es la relaxasa.

La relaxasa es una proteína multidominio, que contiene la actividad de corte del ADN en su extremo N-terminal. Otros dominios, como por ejemplo, el dominio helicasa de las relaxasas MOB_F, se encuentran en posición C-terminal [2]. Las relaxasas pueden ser clasificadas filogenéticamente en ocho familias (F, P, Q, H, C, V, T y B) de las que cinco se encuentran ampliamente representadas entre las Proteobacteria (MOB_V apenas está representada y MOB_T y MOB_B son exclusivas de Firmicutes, Actinobacteria, Tenericutes y Archaea y de Bacteroidetes, [24]).

Aunque las relaxasas de distintas familias (incluso las de una misma subfamilia) guardan una baja identidad de secuencia de aminoácidos, se conservan tres motivos funcionales en todas ellas (con notables excepciones, como las proteínas de MOB_C). El primer motivo, o Motivo I, se denomina catalítico y contiene al menos un residuo Tyr catalítico, encargado de atacar el enlace fosfodiéster de la hebra de ADN que será transferida. El segundo motivo, Motivo II, contiene un residuo Asp o Glu, encargado de activar el hidroxilo nucleofílico del residuo Tyr encargado de realizar el corte en la cadena de ADN. Estos dos motivos se conservan con mayor o menor extensión según la subfamilia MOB que consideremos. El tercer motivo, sin embargo, es mucho más conspicuo. El Motivo III forma la denominada firma de la superfamilia relaxasa (con excepción de MOB_C). Con contadas excepciones, como veremos, tres His forman este motivo. Su función es coordinar un catión divalente, implicado en la catálisis de la reacción de corte de la cadena de ADN [80, 113]. A excepción de los plásmidos HEN, dentro de la subfamilia MOB_{P5}, todas las relaxasas presentan esta tríada de residuos como firma de la relaxasa [1, 2].

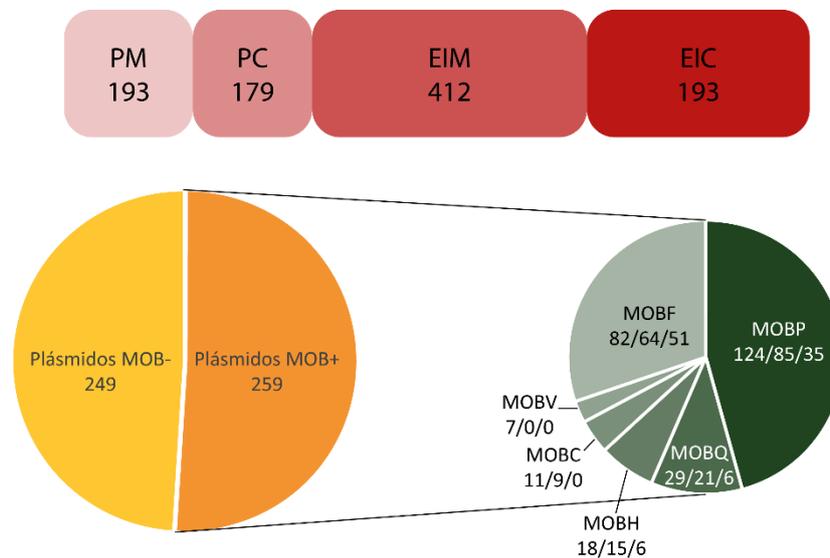


Figura 1.D. Diversidad y clasificación de los elementos móviles. En el panel superior se muestra la abundancia de los distintos elementos transmisibles por conjugación, encontrados en genomas procariotas completamente secuenciados (1207 cromosomas y 891 plásmidos, como se describe en [24]). PM indica plásmidos movilizables, PC indica los conjugativos, EIM indica los elementos integrativos movilizables y EIC los elementos integrativos conjugativos. En el panel inferior izquierdo se detalla la proporción de plásmidos transmisibles (MOB+) y no transmisibles (MOB-) encontrados entre los plásmidos de γ -Proteobacteria. En el panel inferior derecho se detalla la distribución de familias MOB entre los plásmidos de γ -Proteobacteria. Cada serie de números bajo la clase MOB indica, por este orden, el número de plásmidos en esta categoría, el número de ellos detectables por el método de clasificación de MOB por cebadores degenerados (DPMT) y el número de ellos detectables por PBRT, tal como se describe en [114]. Esta figura ha sido modificada de [14].

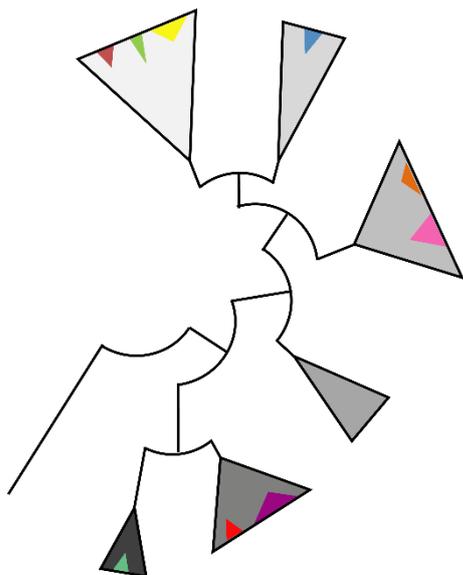


Figura 1.E. Representación de los grupos Inc contenidos en la clasificación MOB. Tomado de [14]. En la figura vemos una representación esquemática que compara la profundidad filogenética de los métodos de clasificación PBRT y DPMT. Los triángulos grises representan los clados monofiléticos que forman cada subfamilia de relaxasas dentro de una familia MOB concreta. Cada uno de estos clados sería amplificable con una pareja de iniciadores DPMT. Los triángulos coloreados contenidos por los anteriores representan relaxasas asociadas a plásmidos de un grupo Inc concreto. Cada uno de estos grupos se puede detectar con una pareja de cebadores PBRT. La base de los triángulos es una estimación de la diversidad contenida en cada clado, mientras que su altura representa la distancia filogenética hasta el último ancestro común del grupo.

A pesar de su baja identidad de secuencia, la resolución de varias estructuras tridimensionales indica que el plegamiento espacial de relaxasas de distintas familias conforma una estructura muy conservada, lo que sugiere un mecanismo de acción común o al menos muy similar [113, 115, 116].

La clasificación de los plásmidos movilizables por medio de la superfamilia relaxasa permite incluir dentro de cada familia MOB un número variable de grupos Inc (figura 1.C.)[114]. La metodología molecular empleada para la clasificación se inspira en el método CODEHOP (por *CO*nsensus-*DE*generated *Hybrid Oligonucleotide Primer*) [117] en el que iniciadores de la PCR semidegenerados son diseñados para permitir la amplificación tanto de los genes conocidos como de sus homólogos distantes. Así se consigue salir de los límites impuestos por el diseño de los cebadores de los métodos PBRT descritos y encontrar y clasificar chasis genéticos que comparten un ancestro común de la relaxasa [14].

En el presente trabajo presentamos un método para la clasificación de los plásmidos en función de su relaxasa. Este método emplea CODEHOP y la clasificación MOB para detectar para detectar y clasificar en familias MOB una mayor cantidad de plásmidos que los métodos anteriores

(método que llamaremos DPMT por *D*egenerated *P*rimers *M*OB *T*yping) Alternando la secuenciación y la tecnología del array en suspensión, el método permite identificar cualquier plásmido amplificado de manera rápida y barata. La validación del método se realizará sobre una colección de controles positivos, específicos de cada familia MOB. También se evaluará *in silico* la exhaustividad y especificidad de los métodos PBRT y DPMT para amplificar los plásmidos disponibles en las bases de datos públicas. Los resultados serán comparados para establecer la potencia de los dos métodos. A continuación, DPMT será empleado para clasificar una serie de colecciones de aislados (clínicos y ambientales) previamente clasificados por los métodos PBRT disponibles en su momento.

De entre todas las secuencias que obtengamos seleccionaremos las que representen relaxasas novedosas y secuenciaremos los plásmidos que las contengan. Así incrementaremos la diversidad contenida en las correspondientes familias MOB. Del mismo modo, los aislados con plásmidos cuyas relaxasas no puedan ser amplificadas y secuenciadas por medio de DPMT, serán seleccionados para la secuenciación completa. Las nuevas relaxasas que se obtengan serán añadidas al flujo de trabajo del método, de manera que en siguientes rondas de rediseño de los iniciadores, sean incorporadas al trabajo y amplíen el rango de moléculas que DPMT puede detectar.

OBJETIVOS

- i) Diseñar y desarrollar una batería de cebadores semi-degenerados para la amplificación de relaxasas, que permita la clasificación rápida de los plásmidos transmisibles de γ -Proteobacteria en base a familias filogenéticas MOB.
- ii) Validar y comparar in silico la especificidad y exhaustividad de los métodos de tipado del replicón por PCR (PBRT) y de tipado de relaxasa por cebadores degenerados (DPMT).
- iii) Validar in vitro la especificidad de DPMT utilizando una colección de relaxasas de referencia, tanto clonadas en vectores de clonación como presentes en plásmidos naturales e introducidos en entornos genómicos conocidos.
- iv) Validar in vitro la exhaustividad de DPMT sobre una serie de colecciones de aislados clínicos y ambientales, previamente caracterizados por PBRT. Comparar los resultados obtenidos en ambos casos.
- v) Establecer un flujo de trabajo para el procesamiento masivo de muestras de aislados de enterobacterias que contengan plásmidos transmisibles, mediante el acoplamiento de DPMT con un sistema de array en solución para la determinación directa de la identidad de los amplicones de los grupos MOB más redundantes.
- vi) Ampliar la diversidad conocida de plásmidos transmisibles. Para ello se secuenciarán y anotarán los plásmidos que contengan relaxasas consideradas nuevas (<95% identidad de secuencia de aminoácidos) o relevantes por pertenecer a determinados grupos MOB con baja diversidad descrita previamente.

SECCIÓN 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos.

Cepas bacterianas

Distinguimos entre cepas de laboratorio y cepas silvestres. Las primeras fueron utilizadas en la clonación de los diferentes genes de relaxasa empleados en las amplificaciones de ADN, en experimentos de conjugación y para la secuenciación de distintos plásmidos de interés detectados en el transcurso de la presente Tesis. Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* DH5 α , UB1637, DLT1411 (*E. coli* C600 *recA::cat*; proporcionada por el laboratorio del Dr. David Lane), HMS174 y J53. Igualmente, contamos con dos cepas de *Pseudomonas putida*, UWC1 y KT2442 (tabla 2.1.A.).

Condiciones generales de cultivo

Empleamos como medio de propagación general el medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB), tanto líquido como sólido (cuando fue necesario). Ambos fueron suplementados con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido nalidíxico (Nx), 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina (Sm), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol (Cm), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rifampicina (Rif) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azida sódica (Azi). Los cultivos en medio LB líquido de las cepas de *E. coli* se hicieron a 37°C, en agitación y durante un mínimo de 8 horas (*overnight* u ON), mientras que las de *P. putida* fueron crecidas en las mismas condiciones, pero a 30°C. Para los cultivos en medio sólido en LB agar se aplicaron las mismas condiciones.

Plásmidos y vectores

Utilizamos dos tipos de vectores de clonación en todos los experimentos. Los vectores de la serie pET3 (Novagen) fueron utilizados para clonar genes de relaxasas representantes de las cinco familias MOB, como se describe más adelante y en [114]. Los vectores pET3 contienen el promotor del fago T7 aguas arriba del sitio múltiple de clonación (MCS), con lo que los insertos quedan bajo su control. Los distintos pET3 empleados eran, además, resistentes a ampicilina (Ap).

El vector pSU19 [118] fue empleado en las primeras fases de la secuenciación de los plásmidos de interés detectados a lo largo del estudio. El vector pSU19 posee un origen de replicación tipo P15 y un gen *cat*, de resistencia a Cm. Además, posee clonado el reportero *lacZ α* , lo cual facilita la detección de colonias transconjugantes cuando son crecidas en medio sólido suplementado con X-gal (ver más adelante).

Tabla 2.1.A. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Fenotipo	Uso	Referencia
<i>E. coli</i>			
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 thi-1 recA1 relA1 gvrA96 deoR</i> m80d <i>lacZ</i> M15 m(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r ^k m ^k) m ⁻	Entorno cromosómico común Células electrocompetentes	Grant, 1990
UB1637	<i>his lys trp recA56 strA (rpsL)</i>	Donante/recipiente en conjugación. Recipiente en conjugación	de la Cruz, 1982
DLT1411	F ⁻ <i>tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44</i> <i>rjbC1 fhuA1</i> m ⁻	Recipiente en conjugación	Appleyard, 1954
HMS174	F ⁻ <i>recA1 hsdR</i> (rK12 ⁻ mK12 ⁺) (DE3) (Ri ^r ^R)	Recipiente en conjugación	Campbell, 1974
J53	F ⁻ <i>pro met</i> (Azi ^R)	Recipiente en conjugación	Jacoby, 1996; Yi, 2012
<i>P. putida</i>			
KT2442	<i>hsdMR</i> (Ri ^r ^R)	Recipiente en conjugación	Nelson, 2002
UWC1	(Ri ^r ^R)	Donante en conjugación	Bagdasarian, 1981

Sección 2

Elegimos una serie de plásmidos representativos de cinco de las seis familias MOB (F, P, Q, H y C; excluimos la familia V debido al escaso número de plásmidos con estas relaxasas presentes entre las γ -Proteobacterias) para que nos sirvieran como colección de controles en los experimentos subsiguientes (ver Sección 2.3. para más detalles). La colección, resumida en la tabla 2.1.B., contiene 33 plásmidos, entre ellos tres plásmidos conjugativos o movilizables completos (pSU316, R751 y pSU4601) y 30 construcciones. El plásmido pSU4280 contiene la región MOB completa del plásmido pKM101, pSU4601 es un derivado KanR del plásmido ColE1 [119] y el resto contienen únicamente el gen de la relaxasa. La colección representa tanto a las mencionadas cinco familias MOB como a 24 de las 27 familias de replicación de los plásmidos de resistencia clásicos [93].

Tabla 2.1.B. Plásmidos y genes de relaxasa utilizados como controles.

Plásmido	Gen	Nº de acceso ^a	Posiciones ^b	Grupo Inc ^c	Subfamilia MOB ^d	Referencia
pSU1588	<i>trwC</i> _R388	BR000038	14128-15007*	IncW	F11	Hernando, 2001
pSU4280	<i>tral</i> _pKM101	U09868	14810-20208*	IncN	F11	Llosa, 2003
pSU10013	<i>traC</i> _pBi709	AY299015	17902-18771*	-	F11	Alvarado, 2012
pSU10014	<i>traC</i> _pWW0	NC_003350	98516-99385	IncP-9	F11	Alvarado, 2012
pSU10017	<i>tral</i> _F	NC_002483	92673-93590	IncFI	F12	Alvarado, 2012
pSU10018	<i>tral</i> _R100	NC_002134	78466-79401	IncFII	F12	Alvarado, 2012
pSU10021	<i>tral</i> _pSLT	NC_003277	87282-88199	IncFII	F12	Alvarado, 2012
pSU316	<i>tral</i> _pSU316	M26937	-	IncFIII	F12	Andrés, 1984
		X55894	-	IncFIV		
		M28097	-			
pSU10022	<i>tral</i> _pED208	AF411480	25650-26552	IncFV	F12	Alvarado, 2012
pSU10010	<i>tral</i> _RP4	X54459	3389-4198*	IncP-1 α	P11	Alvarado, 2012
		NC_001735	-	IncP-1 β	P11	Thorsted, 1998
pSU10028	<i>tral</i> _pBi1063	AY299014	3848-4675*	-	P11	Alvarado, 2012
pSU10029	<i>nikB</i> _R64	NC_005014	67391-68350	IncII	P12	Alvarado, 2012
pSU10056	<i>nikB</i> _R387	M93063	-	IncK	P12	Alvarado, 2012
		X07848	-			
pSU10055	<i>nikB</i> _pO113	NC_007365	62419-63393*	IncB/O	P12	Alvarado, 2012
pSU10001	<i>nikB</i> _pCTX-M3	NC_004464	32027-33049	IncL/M	P131	Alvarado, 2012
pSU10012	<i>mobA</i> _pRAS3.1	NC_003123	10571-11395*	IncQ2	P14	Alvarado, 2012
		Y10906	-			
pSU10011	<i>taxC</i> _R6K	X95535	-	IncX2	P31	Alvarado, 2012
		NC_010919	10360-11355	IncU		
pSU10009	<i>nic</i> _pRA3	NC_010919	10360-11355	IncU	P42	Alvarado, 2012
pSU4601	<i>mbeC</i> _ColE1	NC_001371	-	ColE1	P51	Cabezón, 1997
pSU10006	<i>mobA</i> _p9555	NC_010069	3368-4394	-	P52	Alvarado, 2012
pSU10007	<i>mobA</i> _pAsall	NC_004338	1052-2017	-	P53	Alvarado, 2012
pSU10064	<i>mobA</i> _RSF1010	NC_001740	3250-3807	IncQ1	Q11	Alvarado, 2012
pSU10059	<i>ORF1</i> _pP	NC_003455	9-1244	-	Q12	Alvarado, 2012
pSU10008	<i>mobA/mobL</i> _pIGWZ12	NC_010885	1257-2240*	-	Qu	Alvarado, 2012
pSU10039	<i>tral</i> _R27	NC_002305	106098-106934*	IncHI1	H11	Alvarado, 2012
pSU10040	<i>tral</i> _R478	NC_005211	192385-193308	IncHI2	H11	Alvarado, 2012
pSU10041	<i>tral</i> _pCAR1	NC_004444	124079-125008	IncP-7	H11	Alvarado, 2012
pSU10004	<i>tral</i> _pSN254	NC_009140	46409-47593	IncA/C	H121	Alvarado, 2012
pSU10003	<i>tral</i> _R391	AY090559	32341-33509	IncJ	H121	Alvarado, 2012
pSU10043	<i>tral</i> _2_pKLC102	AY257538	99952-100788	-	H2	Alvarado, 2012
pSU4830	<i>mobC</i> _CloDF13	NC_002119	-	-	C11	Núñez, 2001
pSU10002	<i>triL</i> _p29930	AJ519722	31361-32107	-	C12	Alvarado, 2012

a: Número de acceso del plásmido que codifica la correspondiente relaxasa.

b: Coordenadas, en el plásmido correspondiente, del fragmento del gen de la relaxasa clonada. Un asterisco indica codificación en la cadena complementaria. Un guión indica que no se tiene una secuencia anotada que sirva de marco de referencia (pSU10056 y pSU10011) o que se trata del plásmido completo que contiene todo el gen relaxasa (pSU316, R751, pSU4601 y pSU4830).

c: Grupo de incompatibilidad del plásmido salvaje. Un guión indica que no se halla definido.

d: Subfamilia MOB de cada plásmido considerado

2.2. Protocolos de uso común.

Reacción en cadena de la polimerasa

Utilizamos un protocolo estándar de amplificación para prácticamente todas las PCR del trabajo.

La mezcla de reacción utilizada contenía:

- Tampón de reacción (de la casa comercial), a concentración 1X.
- MgCl₂, 1.5 μM.
- dNTPs, 1μM.
- Oligonucleótidos, cada uno a 1μM.
- Polimerasa, 1U. Se empleó BioTaq (Bioline) para las amplificaciones rutinarias y Vent (New England Biolabs) para las amplificaciones de insertos de genes de relaxasa (ver apartado *Genoteca por amplificación*) y de fragmentos mayores de 1kb. ADN molde. Debido al método de extracción, la concentración de ADN molde era desconocida. Se optó por añadir entre 2 y 5 μL por reacción para evitar inhibiciones de la polimerasa por exceso de molde.
- H₂O destilada, hasta completar el volumen de reacción, que habitualmente era de 50 μL.

El protocolo de amplificación incluye tres pasos, **i**) 4 minutos de desnaturalización a 94°C, **ii**) amplificación de la cadena molde con sus oligonucleótidos específicos y **iii**) parada, a 4°C, sin tiempo determinado. El paso de amplificación comprende tres partes, una nueva desnaturalización durante 30 segundos, la hibridación de los oligonucleótidos con la secuencia diana (este paso tiene una temperatura variable, dependiente de la secuencia de los cebadores y de los productos observados durante la validación de los mismos; ver sección 2.4) durante otros 30 segundos y una elongación de otros 30 segundos (este tiempo es variable, dependiendo del tamaño esperado del amplicón). Este ciclo se repite entre 25 y 30 veces, en función de la intensidad de la amplificación observada en los controles durante el proceso de validación (ver sección 2.4.).

Para eliminar amplificaciones inespecíficas se optó por cuatro vías. Primero, variación de la temperatura de hibridación, en general al alza. Así la hibridación se vuelve más restrictiva, con lo que únicamente dianas más semejantes a las secuencias del cebador serán reconocidas y amplificadas. Segundo, reducción del tiempo de hibridación. Al reducir el tiempo en el que hay una temperatura adecuada para la hibridación, reducimos la posibilidad de una interacción inespecífica. Tercera, incrementamos la cantidad de MgCl₂ en la mezcla de reacción. La presencia de esta sal en el medio surte el mismo efecto restrictivo que el incremento de la temperatura. Cuarto, en el caso de productos inespecíficos muy persistentes, empleamos un protocolo de PCR en *touchdown* [120]. En esencia, el protocolo consiste en comenzar el paso de amplificación con temperaturas de hibridación muy cercanas a la temperatura de fusión predicha para los cebadores empleados. Las dianas 100% idénticas serán las únicas capaces de hibridar, de manera que obtendremos muy poco producto, pero será el específico. En cada uno de los ciclos del paso de amplificación, la temperatura de hibridación se reduce un grado, de manera que se facilita la amplificación de un conjunto de moléculas de ADN que cada vez está más enriquecido en secuencias diana y la probabilidad de hibridación de los cebadores. Al llegar a la temperatura de hibridación ideal de los cebadores, se repite la amplificación a dicha temperatura durante otros diez ciclos, obteniéndose así la amplificación específica del fragmento deseado en cantidades apreciables.

Elaboración de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes se obtuvieron siempre de la cepa DH5α, ya que se pretendía tener todos los plásmidos de la colección de validación en un mismo entorno cromosómico. De esta manera, los resultados de posteriores amplificaciones de control serían comparables.

Se prepara un preinóculo de 50 mL en LB, suplementado con Nx. Se crece ON, a 37°C y se inocula 1/20 en LB Nx, dejándose crecer hasta que la densidad óptica (DO 600 nm) del cultivo quede en la horquilla de 0.6-0.8 unidades. Así se garantiza que las células se encuentran en su fase de crecimiento exponencial. A partir de este punto, todos los pasos deben hacerse en frío para evitar una mayor proliferación de las células bacterianas y en atmósfera estéril para evitar contaminaciones.

Se recuperan las células por centrifugación suave (4000 rpm; 20 minutos; a 4°C), en tubos Falcon de 50 mL estériles. Cada pellet obtenido es resuspendido de forma suave en agua miliQ, estéril y fría, dos veces. Al resuspender de forma suave, evitamos la rotura de las células por fuerzas mecánicas. El último paso de resuspensión lo hacemos en glicerol 10% estéril y frío. Volvemos a decantar las células como anteriormente y resuspendemos todos los pellets en 1 mL de glicerol 10% estéril y frío. Repartimos el volumen final de células en alícuotas de 50 µL, que depositaremos en tubos eppendorf, previamente enfriados en hielo seco. Así, las células electrocompetentes se congelan al instante, favoreciendo la conservación de sus cualidades.

Con dos de las alícuotas preparadas se lleva a cabo una prueba del rendimiento de las células, transformadas con un ADN de concentración conocida, en nuestro caso, el vector de clonación pUC18. Una cantidad conocida de ADN microdializado (ver protocolo de transformación, más adelante) es introducido por electroporación en una de las alícuotas del ensayo, mientras que en la de control se introduce simplemente agua destilada. Diluimos las alícuotas 1:10 y 1:100. Se siembran ambas diluciones en medio LB-agar suplementado con NxAp. Las placas de control no crecerán, mientras que en las transformantes podremos contar colonias. Un resultado igual o superior a las 10⁷ colonias por µg de ADN utilizado en la transformación, indica que las células competentes obtenidas son de buena calidad.

Construcción de una genoteca por amplificación

La genoteca construida de este modo es la que se presenta en la tabla 2.1.B. Las regiones a clonar de cada gen fueron delimitadas utilizando dos *softwares* diferentes de predicción de estructura secundaria: GOR (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) [121] y PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [122, 123]. En ambos casos, buscamos como dianas de hibridación para los oligos de clonación, secuencias que no influyeran en la conformación espacial de la potencial estructura terciaria. En todos los casos, los fragmentos a clonar constaron de alrededor de 900 pares de bases (excepto el caso del gen *triL_p29930*, que se clonó en su longitud total de 746 pares de bases).

Amplificamos estos fragmentos por medio de un protocolo estándar de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Utilizamos la polimerasa de alta fidelidad Vent (temperaturas de hibridación entre 45° y 55°C; New England Biolabs). Los oligonucleótidos específicos contenían **i**) una diana tipo *NdeI* o *NcoI*, en el caso de que exista una diana *NdeI* en la secuencia a clonar (5'-CA[^]TATG-3') más un codón de inicio AUG en el caso de los oligonucleótidos directos (solo cuando se usa *NcoI*), **ii**) una diana de tipo *BamHI* (5'-G[^]GATCC-3') más un codón de STOP para los oligonucleótidos reversos (las tres enzimas son de la firma Fermentas) o **iii**) una diana *NdeI* tanto en el directo como en el reverso, debido a la presencia de dianas *BamHI* dentro de la secuencia a amplificar. Visualizamos los resultados de la PCR en geles de agarosa 1% con una muestra de 2 µL. Purificamos el resto del ADN usando el kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma). Digerimos las bandas obtenidas con los enzimas de restricción mencionados, según las

dianas que contengan (200ng de ADN, 0,3 U/ μ L de enzimas, una hora y media a 37° C) y purificamos los productos resultantes tras visualizarlos en un gel de agarosa 1% (GenElute™ Gel Extraction Kit; Sigma).

La preparación del vector de clonación es similar, salvo porque se debe extraer el ADN de pET3a o pET3d (New England Biolabs) por medio del kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Tras la digestión del vector con la correspondiente pareja de enzimas (200ng de ADN, 0,3 U/ μ L de enzimas, una hora y media a 37° C), se somete al vector a una defosforilación de los extremos cohesivos, para evitar su recircularización, con fosfatasa alcalina (una hora a 37°C). Posteriormente, el material digerido y defosforilado se visualiza en un gel, de donde purificamos la banda correspondiente al tamaño del plásmido lineal.

Se comprueba la concentración final de vector e inserto en un gel de agarosa 1%. La ligación se produce según indicaciones del fabricante (Fermentas). El producto resultante es microdializado para eliminar las sales del *buffer* de la ligasa, que interfiere con la electroporación, según indicaciones del fabricante (filtros de microdiálisis de poro de 0.05 μ m; Milipore).

Electroporamos las *E. coli* DH5 α electrocompetentes en un dispositivo Gene Pulser (BioRad), en modo Ec02 y con cubetas de 0,2 cm de grosor. A continuación, añadimos 1 mL de LB fresco y estéril a las células e incubamos durante media hora, a 37°C, sin agitación. Así, las células transformadas comienzan a expresar los genes de resistencia. Por último, sembramos sin diluciones, en medio selectivo para la cepa y el vector. Se comprobó que estas colonias contenían el clon deseado, en la orientación adecuada (esto es, bajo el control del promotor de T7), amplificando la construcción con los cebadores del promotor y terminador del fago T7, contenidos en todos los vectores pET3. En los casos en los que se empleó únicamente NdeI para clonar el gen, se utilizaron los cebadores terminador del fago T7 y directo de clonación. La identidad de los genes clonados fue comprobada por secuenciación (Macrogen, Amsterdam).

Construcción de una genoteca por sonicación

Este protocolo fue utilizado para secuenciar los plásmidos con relaxasas nuevas que fuimos encontrando a lo largo del presente trabajo. Se trata de construir una genoteca compuesta de fragmentos de ADN de tamaño homogéneo, obtenidos al romper el plásmido circular covalentemente cerrado por medios físicos. Esto hace que los puntos de rotura sean aleatorios y que las secuencias que se obtengan de cada clon vayan solapándose hasta completar el plásmido por ambos extremos.

El ADN plasmídico fue extraído de transconjugantes que solo contenían el plásmido de interés (ver protocolo de *Conjugación* más adelante) utilizando el Plasmid MaxiPrep Kit (Sigma), según indicaciones del fabricante. Aproximadamente 20 μ g de este ADN fue sonificado en un dispositivo Bioruptor (Diagenode) en atmósfera refrigerada (4°C) y en con hielo en la cubeta de sonicación. La cantidad óptima de fragmentos del tamaño se obtiene con siete ciclos de sonicación de 30 segundos, seguidos de sendos descansos de otros 30 segundos cada uno.

Los fragmentos producidos se visualizaron en un gel de TBE-agarosa al 1%. Recortamos y purificamos (GenElute™ Gel Extraction Kit; Sigma) el ADN situado en las proximidades de la banda de 1500 pb del marcador de tamaños utilizado (Hyperladder I; Ecogen). Los posibles extremos cohesivos de los fragmentos recuperados fueron eliminados utilizando la polimerasa a prueba de errores del CHIP-Seq DNA Sample Prep Kit (Illumina Corp.). Este enzima actúa eliminando las bases sobrantes en sentido 3' y

rellenando las ausentes en 5'. Purificamos los fragmentos así tratados con el GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) y reservamos.

Como vector de clonación empleamos pSU19 [118], descrito en la sección *Plásmidos*. pSU19 fue linealizado utilizando el enzima *SmaI* (5'-CCC^GGG- 3'; Fermentas) y seguimos el protocolo explicado para los vectores de expresión de la serie pET3 para evitar su recircularización. Ligamos los fragmentos de los plásmidos a secuenciar con el vector linealizado de la manera que ya hemos explicado y transformamos la genoteca en DH5 α como ya hemos descrito. Seleccionamos los transformantes conteniendo un vector con inserto, en medio LB agar suplementado con Cm (25 μ g/mL) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (BCIG o más comúnmente, X-gal; 60 μ g/mL; Sigma). Las colonias blancas, incapaces de metabolizar la X-gal, portarán uno de los clones de interés. Cada potencial construcción fue amplificada con los oligonucleótidos universales del vector pSU19 [118]. Los que demostraron tener un inserto del tamaño esperado fueron propagados en LB suplementado con Cm (25 μ g/mL), fueron extraídos con el Plasmid MiniPrep Kit (ATP Biotech Inc.) y secuenciados en Macrogen (Ámsterdam). Se procuró obtener una cobertura de lectura de la secuencia de 3X o más en cada posición. Los huecos en la secuencia que se fueron presentando se rellenaron por amplificación y secuenciación de los amplicones.

Conjugación

Las cepas que se utilizaron para conjugación se describen en la tabla 2.1.A. Los experimentos de conjugación se llevaron a cabo para introducir plásmidos de interés, provenientes de cepas salvajes, en cepas de laboratorio de trasfondo cromosómico conocido. Brevemente, las cepas donante y receptora se crecen ON, en medio líquido con el antibiótico adecuado para seleccionar cada una de ellas. Sus densidades ópticas a 600 nm son determinadas y ajustadas para que en ambos casos tengamos la misma cantidad de células en la superficie de conjugación. Las células son centrifugadas suavemente para evitar su ruptura por fuerzas físicas (4000 rpm; 5 minutos). Retiramos el sobrenadante y lavamos las células con medio fresco. Repetimos el proceso y resuspendemos las células en el volumen adecuado para adecuar las cantidades de células en la superficie de conjugación.

En una placa de 24 pocillos ponemos 1 mL de LB agar en cada uno de ellos. Sobre cada superficie, colocamos 10 μ L de las células donantes y receptoras cuya DO acabamos de ajustar y las mezclamos suavemente, utilizando la punta de la pipeta. Incluimos pocillos de control, únicamente con células donantes o receptoras. Procuramos eliminar las posibles burbujas, ya que su estallido puede ser causa de una contaminación cruzada. La conjugación tuvo lugar durante una hora y media, a 37°C y sin agitación. Tras este tiempo, la conjugación fue detenida resuspendiendo las células en un mL de LB fresco y estéril. Las cepas incapaces de conjuguar en medio sólido (ver sección 3.4.) pasaron por un protocolo de conjugación en medio líquido, que en esencia es igual que el anterior, salvo porque el medio LB es líquido.

Seleccionamos los transconjugantes sembrando las células resuspendidas en medio LB agar suplementado con los antibióticos selectivos de la célula receptora más el del plásmido de interés. También sembramos los controles (donante y receptor) en los mismos medios, para descartar la contaminación del experimento. Seleccionamos varias colonias puntuales entre las que crecieron en el medio apropiado y comprobamos que contienen el plásmido que nos interesa por PCR con los cebadores adecuados para amplificar cada relaxasa.

2.3. Herramientas informáticas.

Análisis filogenético

La búsqueda de moléculas de la superfamilia relaxasa se llevó a cabo con PSI-BLAST, parte de la familia de *software* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [124]. BLAST es el programa básico de búsqueda, que sirve para búsqueda tanto de homólogos de secuencias de ADN como de aminoácidos. A menos que se indique lo contrario, en el presente trabajo hemos realizado siempre búsquedas en las bases de datos utilizando secuencias de aminoácidos.

Para las búsquedas recurrentes en la base datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizamos los 300 primeros aminoácidos de las relaxasas de cada una de las familias MOB descritas en la bibliografía [1, 2, 4]. Como condiciones de trabajo usamos BLOSUM62 para la primera búsqueda de homólogos y un valor E de 10^{-4} (una probabilidad máxima de uno entre diez mil de encontrar un alineamiento no significativo entre el resultado del proceso). Los resultados fueron filtrados automáticamente para eliminar los resultados de cromosomas bacterianos y para conservar solo los de plásmidos nativos del Phylum Proteobacteria. De manera manual se eliminaron los resultados de genomas (del tipo que fueran) sin apuntar.

De todas las moléculas obtenidas en la convergencia y conservadas tras las purgas, los primeros trescientos residuos fueron alineados utilizando el algoritmo ClustalW [125] incluido en el programa AlignX (Informax). El alineamiento por parejas de todas ellas les proporciona una puntuación en función de una matriz de sustituciones (que incluye la existencia de huecos y su extensión en el mismo). La matriz de puntuación resultante se usa para construir un árbol guía (i.e., no un árbol filogenético propiamente) con la raíz en el centro de todas las secuencias. El alineamiento definitivo se hace alineando las secuencias ordenadamente, desde el extremo de las ramas hasta la raíz.

Los alineamientos obtenidos se usaron para reconstruir las filogenias (actualizadas a fecha de enero de 2012) de cada una de las familias MOB. Un árbol filogenético es un estimador gráfico de la historia evolutiva de una serie de taxones, construido generalmente con un conjunto de datos incompleto. La topología se compone de nodos, ramas y taxones. Los taxones se sitúan en los extremos de las ramas y éstas se encuentran unidas por nodos. Un nodo, por tanto, representa un ancestro común en la historia evolutiva de dos o más taxones, del que no tenemos datos empíricos disponibles. La distancia de las ramas que separan dos taxones es una medida de la distancia evolutiva entre los mismos. La mayor o menor robustez del árbol filogenético reconstruido depende, en gran medida, del método de reconstrucción utilizado y del cumplimiento de sus asunciones teóricas.

La reconstrucción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo usando el programa MEGA4.0 [126]. El algoritmo empleado fue el conocido *neighbour joining* (NJ) [127], que es un método clasificado como de mínima evolución. Este método construye una matriz cuadrada de distancias entre las secuencias en base a la proporción de aminoácidos distintos en cada comparación posible. El árbol inicial incluye todos los taxones sin agrupar, teniendo su grafo forma de estrella. Luego, cada taxón se va agrupando con sus vecinos de manera que la suma de las distancias entre dos taxones unidos directamente sea menor que la de cualquiera de las posibles topologías en las que éstos estén separados. Por tanto, el árbol final será aquel cuyo sumatorio de las distancias evolutivas (i.e., las longitudes de las ramas) sea la menor posible.

La simplicidad del método NJ permite la validación, igualmente rápida, de la confianza estadística de la topología obtenida. Dicha cualidad se evalúa por medio de *bootstrapping* [128], que consiste en aplicar la técnica de re-muestreo de Efron [129]. En él, las posiciones de las secuencias alineadas son permutadas al azar y una nueva filogenia es reconstruida con el mismo método que la inicial. A continuación, ambas son comparadas y se puntúa a las ramas comunes en ambas reconstrucciones. Este proceso se lleva a cabo, en nuestro caso, mil veces, tras lo cual, cada rama del árbol original tendrá un valor de *bootstrap* porcentual representativo de la significación estadística de cada nodo. Valores mayores o iguales al 95% indican que la topología de la rama considerada es cierta [130].

2.4. Cebadores degenerados para identificar familias MOB (DPMT).

A partir de los árboles filogenéticos de cada familia MOB elegimos los nodos con valores de *bootstrap* mayores de 95 que mayor número de taxones agruparan. Analizamos visualmente el alineamiento correspondiente en busca de secuencias muy conservadas, cercanas o contenidas en alguno de los tres motivos definitorios de la superfamilia relaxasa (*i.e.*, el motivo I, que contiene los residuos catalíticos, el motivo II, de interacción con la cadena de ADN o el motivo III, que coordina un catión divalente y ayuda en la reacción de corte de la cadena de ADN). En los casos de MOB_H y MOB_C, nos basamos en los motivos conservados no canónicos definidos en la literatura [1, 2]. En determinados casos, la diversidad del grupo de taxones considerados hizo imposible encontrar áreas de conservación lo suficientemente amplias como para diseñar cebadores adecuados. Se consideraron sub-grupos dentro de los primeros, procurando conservar valores de *bootstrap* mayores o iguales del 95% y se repitió el proceso de análisis visual.

Los cebadores fueron diseñados según la estrategia CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers) [16]. Ésta consiste en que el oligonucleótido diseñado contiene dos partes diferenciadas: la parte 3' se basa en un mínimo de 4 aminoácidos conservados y se encuentra degenerada para contemplar todas las posibilidades del código genético. La última posición siempre se deja sin degenerar para que el extremo 3' no quede libre, provocando así que la polimerasa se suelte e interrumpa la elongación de la cadena. A esta parte se le llama núcleo degenerado. La parte 5' del cebador es una secuencia consenso, sin degenerar, diseñada a partir de los nucleótidos más conservados de la región adyacente a la parte degenerada. Esta parte se llama cebo consenso. Ambas partes tienen funciones distintas. En las primeras rondas de amplificación, el núcleo degenerado tiene una probabilidad inversamente proporcional a su degeneración (*d*) de hibridar perfectamente con la secuencia diana. Sin embargo, el cebo consenso hibridará siempre de manera imperfecta con ella. Es por tanto labor del núcleo degenerado detectar las moléculas de ADN homólogas a la agrupación filogenética utilizada para su diseño. Mientras, el cebo está ahí para proporcionar la estabilidad termodinámica que necesita la polimerasa para proceder a la reacción de amplificación. En los siguientes pasos de amplificación, el cebo consenso de la mezcla de cebadores hibridará perfectamente con el producto, mientras que en el núcleo degenerado, únicamente las posiciones no degeneradas hibridarán perfectamente con el producto, exceptuando la combinación que inició la reacción (figura 2.4.A.). Este número de posiciones hibridadas son suficientes para que la polimerasa no encuentre impedimentos topológicos que le impidan continuar su tarea. De esta manera, se obtiene un producto específico y fuertemente amplificado. En la práctica, el empleo de cebadores semi-

degenerados para amplificación de homólogos lejanos equivale a realizar una PCR en la que hay distintas parejas de oligonucleótidos en la mezcla de reacción, es decir, equivale a una *multiplex PCR*.

A modo de ejemplo de todo el proceso de diseño, proporcionamos la figura 2.4.B., en la que se detalla la secuencia de trabajo seguida en el diseño de los oligonucleótidos degenerados MOB_{F11} (las secuencias de esta y las otras 37 parejas de oligonucleótidos degenerados, se encuentran en la tabla 2.4.A.). En el núcleo degenerado del ejemplo hay tres posibles posiciones para degenerar, las terceras letras de los codones que codifican los residuos D, D e Y. Según las secuencias de aminoácidos alineadas, cada uno tiene dos posibles nucleótidos que los codifican en el código genético. Así, la degeneración resultante del núcleo degenerado del oligonucleótido directo F11 sería de ocho grados (2x2x2 posibles combinaciones de nucleótidos). Esto quiere decir que habría una probabilidad entre ocho de que una secuencia concreta de una relaxasa relacionada con este grupo de secuencias fuera detectada por esta parte del cebador directo. El cebo consenso está resaltado por la parte continua de la flecha y su secuencia fue construida teniendo en cuenta, principalmente, la frecuencia de aparición de los distintos nucleótidos. Para las posiciones irresolutas, consideraciones secundarias, como el contenido G+C global del cebador o la temperatura de fusión resultante, determinaron finalmente tomar un nucleótido u otro como definitivo.

En el diseño de todos los cebadores consideramos solo las secuencias existentes en las bases de datos. Evitamos utilizar los aminoácidos codificados por seis codones (*i.e.*, arginina, leucina y serina). Así, reducimos la degeneración de los cebadores y aumentamos la especificidad de los ensayos, incrementando la proporción de oligonucleótidos capaces de hibridar con la diana. La degeneración elevada permite la detección de homólogos más lejanos de las proteínas modelo, pero a la vez producirá amplificaciones inespecíficas debidas al exceso de cebadores en la mezcla de reacción. Esto reducirá la especificidad a niveles sub-óptimos, enmascarando el producto esperado [16].

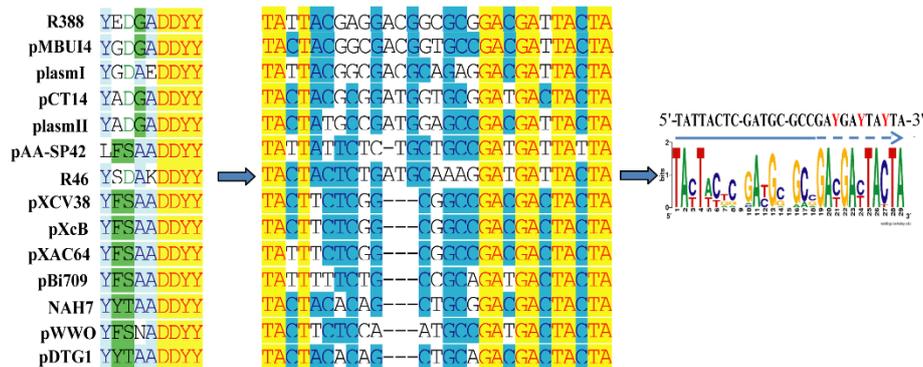


Figura 2.4.B. Workflow para el diseño de cebadores semi-degenerados, siguiendo la filosofía CODEHOP [16]. El panel de la derecha muestra el alineamiento del motivo conservado I de 14 relaxasas de la subfamilia MOB_{F11}. Los residuos conservados en todos ellos se muestran como letras rojas sobre fondo amarillo. El panel central muestra las correspondientes secuencias de nucleótidos. El mismo código de color representa las bases conservadas en todas las secuencias. El panel de la derecha muestra un logo construido *online* a partir del anterior alineamiento de ADN (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). En cada posición considerada se representa la abundancia relativa de las bases por medio de su altura. El cebo consenso está resaltado por una línea azul continua y el núcleo degenerado por una línea azul discontinua. Sobre el logo se indica el oligonucleótido que de él se obtendría. Las posiciones indefinidas se indican con un guión, mientras que las posiciones degeneradas se indican en color rojo. Figura modificada de [3].

Sección 2

Igualmente, la cantidad de oligonucleótidos con una diana detectable se reducirá en proporción inversa al grado de degeneración, reduciendo la amplificación hasta niveles indetectables en algunos casos. Por tanto, es necesario un compromiso entre el rango de moléculas detectables y la especificidad de la reacción. El uso de motivos aminoacídicos altamente conservados en la superfamilia relaxasa y el sesgo de las terceras posiciones de cada codón, nos permitieron diseñar un conjunto de sondas que detectan un número máximo de relaxasas relacionadas, sin producir amplificaciones inespecíficas. En total, 38 parejas de oligonucleótidos para la amplificación de las cinco familias MOB consideradas se presentan en la tabla 2.4.A., así como de las principales variaciones introducidas sobre la PCR estándar utilizada (expuesto en la sección 2.2.).

Tabla 2.4.A. Lista de los cebadores degenerados utilizados en el sistema DPMT.

Nombre del cebador	Secuencia ^a	Condiciones de PCR ^b	Prototipo MOB ^c	Amplión (pb) ^d	Localización ^e
<i>F11-f</i> <i>F1-r</i>	gca gcg tat tac ttc tct gct gcc gay gay tay ta act ttt ggg cgc gga raa bfg sag rtc	25 ciclos, 53°C	R388	234	13876-14047*
<i>F12-f</i> <i>F1-r</i>	agc gac ggc aat tat tac acc gac aag gay aay tay ta act ttt ggg cgc gga raa bfg sag rtc	25 ciclos, 55°C	F	234	92744-92912
<i>P11-f</i> <i>P1-r</i>	cgt gcg aag gcc gac aar ach tay ca agc gat gtg gat gtg aag gtt rtc ngt rtc	25 ciclos, 60°C	RP4	180	50361-50484*
<i>P12-f</i> <i>P1-r</i>	gca cac tat gca aaa gat gat act gay cev gtt tt agc gat gtg gat gtg aag gtt rtc ngt rtc	30 ciclos, 53.8°C, 1.5U Taq por reacción	R64	189	67744-67867
<i>P131-f</i> <i>P1-r</i>	aac cca cgc tgc aar gay cev gt agc gat gtg gat gtg aag gtt rtc ngt rtc	30 ciclos, 59°C, 15 segundos de extensión por ciclo	pCTX-M3	180	32365-32491
<i>P14-f</i> <i>P1-r</i>	cgc agc aag gac acc atc aay cay tay rt agc gat gtg gat gtg aag gtt rtc ngt rtc	25 ciclos, 50°C	pRAS3.1	174	11053-11169*
<i>P3-f</i> <i>P3-r</i>	cc gtg agc caa atc aca cag aaf atk rtb tt cg aaa gcc aac atg aac atg hgg atk htc	25 ciclos, 50°C	R6K	177	38419-39573*
<i>P4-f</i> <i>P4-r</i>	gcg ttc agg atg gtc yfb fcs atg ce c ggt ttt gac cgt cag atg svm atg cgg	25 ciclos, 64°C ^f	pRA3	163	10695-10803
<i>P51-f</i> <i>P5-r</i>	t acc acg ccc tat gcg aar aar tay ac cc ctt gtc ctg gtg yts nac cca	30 ciclos, 58°C, 20 segundos de extensión por ciclo	ColE1	167	572-688
<i>P52-f</i> <i>P5-r</i>	gat agc ctt gat ttt aat aac acc aay acy tay ac cc ctt gtc ctg gtg yts nac cca	30 ciclos, 58°C, 20 segundos de extensión por ciclo	p9555	175	3536-3652
<i>P53-f</i> <i>P53-r</i>	g ggc tgc cac gay cay acn gg gc cca gcc ctt ttc rtg rtt rtg	30 ciclos, 65°C	pAsa11	345	1136-1480
<i>Q11-f</i> <i>Q11-r</i>	caa tgc tcc aag gcg aar gen gay ta cg etc gga gat cat cay ytg yca ytg	30 ciclos, 50°C	RSF1010	331	3325-3606
<i>Q12-f</i> <i>Q12-r</i>	ctg gaa tat act gaa cac ggn aay atg cc atc ctt ggt gtt agc acg ttt raa rwa ytg	30 ciclos, 52°C	pP	341	975-1256
<i>Qu-f</i> <i>Qu-r</i>	agc gcc gtg ctg tcc geb gen tay cg ctc cgc agc ctc grc sgc rtt cca	30 ciclos, 64°C	pIGWZ12	179	2034-2162*
<i>H11-f</i> <i>H11-r</i>	ccg gcg tgc gag aay cay cay ca aag gtc gta tac ctt ycg kgc rtc rtg	<i>Touchdown</i> PCR: comienzo a 65°C ΔTa= -1°C por ciclo, 15 ciclos a 55°C	R27	207	106380-106536
<i>H121-f</i> <i>H121-r</i>	g cca gct tcc gaa tca cay cay cay cg g tgc ctt gtc gcc cca ceg dat raa rta	25 ciclos, 59°C	pSN254	313	46714-46981
<i>H2-f</i> <i>H2-r</i>	ag ttc cca gcc tca gaa atc cay cay cay kc g cgg acc gtg cca ngg rtg cca	25 ciclos, 68°C	pKLC102	264	100218-100428
<i>C11-f</i> <i>C11-r</i>	gt cag gtc agc gtg tgg ggn ctn ac ct ctt cac ggt gcc ctc nac ytc raa	<i>Touchdown</i> PCR: comienzo a 65°C ΔTa= -1°C por ciclo, 20 ciclos a 55°C	CloDF13	283	2874-3106
<i>C12-f</i> <i>C12-r</i>	gc acg act gga aaa ata tgc cta tgg ggn ath ac caa cgt gat aat ccc gtc rgg vcg rtg	30 ciclos, 59 ^a	p29930	257	31594-31789

a: En cada secuencia, los núcleos degenerados están señalados en negrita y los cebos consenso se indican en letra normal. Los codones subrayados no consideran toda la variabilidad del código genético para evitar una degeneración excesiva. Las secuencias están sesgadas para considerar únicamente la diversidad existente en las bases de datos.

b: Condiciones específicas de cada protocolo de amplificación.

c: Plásmido prototipo de cada subfamilia MOB.

d: Tamaño del amplión obtenido de la amplificación de cada prototipo.

e: Coordenadas de los nucleótidos amplificados de cada prototipo. Un asterisco indica que el gen de la relaxasa está codificado en la cadena complementaria.

f: Cuando se usa como molde ADN extraído de *Salmonella enterica* produce un amplión inespecífico. Este efecto se elimina utilizando un protocolo *touchdown* equivalente a los otros expuestos. Véase la sección 3.1. para más información.

El conjunto de cebadores diseñado se denomina Cebadores Degenerados para Tipado de MOB (*Degenerate Primer MOB Typing*, DPMT, por sus siglas en inglés) [114]. La validación de la especificidad del conjunto se llevó a cabo con la colección de referencia detallada en la tabla 2.1.B. Las variaciones más notables en el protocolo de amplificación empleado fueron las siguientes:

- La temperatura de hibridación de cada pareja de cebadores DPMT, que se ajustó por tanteo con un gradiente de temperatura.
- La reacción con los cebadores *P12* requirió añadir más cantidad de polimerasa en la mezcla de reacción por los bajos rendimientos obtenidos. La cantidad llegó hasta las 1.5 U.
- El número de repeticiones del paso de amplificación varió entre 25 y 30, dependiendo de la intensidad del amplicón obtenido en cada ocasión.
- El tiempo de hibridación permitido se redujo a 30 segundos para evitar que secuencias remotamente semejantes fueran reconocidas por casualidad.
- El tiempo de extensión permitido a la polimerasa varió entre 15 y 30 segundos, en función de la longitud del fragmento esperado. Un tiempo de elongación excesivo puede llevar a la amplificación de fragmentos mayores, inespecífica y aleatoriamente reconocidos por los cebadores.
- En los casos de las parejas de cebadores *H11* y *C11*, la aparición persistente de inespecificidades obligó a hacer uso del protocolo de PCR denominado *touchdown PCR* [120], en el que la temperatura de hibridación comienza siendo muy próxima a la de desnaturalización predicha para el oligonucleótido para evitar que reconozcan inespecíficamente secuencias remotamente semejantes. En los ciclos sucesivos, la temperatura de hibridación va descendiendo un grado por ciclo, hasta que llega a la temperatura ideal de hibridación. Una vez allí, el resto de ciclos de amplificación se realiza sin variar la misma.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2% p/v, teñidos con RedSafe (CHEMBIO) y utilizando un transiluminador UV Geldoc (Biorad, California).

2.5. Array en suspensión.

Este protocolo sirve para identificar una relaxasa amplificada por medio de los cebadores DPMT, sin necesidad de acudir a la secuenciación convencional. El concepto teórico subyacente es el siguiente: intentar, por medio de los oligos DPMT, clasificar el grupo filogenético de pertenencia de una relaxasa desconocida (*e.g.*, dentro de MOB_{F11}, MOB_{F12}, MOB_{P11}, etc). Al intentar hacer esto con colecciones hospitalarias o ambientales, muy numerosas, la secuenciación como método de identificación pasa a ser costosa y lenta. Este lastre se puede evitar al utilizar métodos procesamiento de alto rendimiento (HTP, de aquí en adelante). Otra ventaja del array en suspensión consiste en que nos permitirá discriminar entre relaxasas de un mismo grupo MOB, amplificadas en la misma muestra, por la misma pareja de cebadores DPMT. Un caso concreto de esto lo representan las relaxasas del subgrupo MOB_{P12}. Éstas se amplifican con la pareja DPMT *P12-f+P1-r* y se encuentran en plásmidos de los grupos IncI1, IncK e IncB/O. Un aislado con varios plásmidos de estos grupos de replicación produciría una serie de amplicones indistinguibles por secuenciación, pero identificables por medio de esta técnica, como veremos.

Sección 2

La técnica del *array* en suspensión es una metodología de HTP semejante a un *array* en sólido, que, entre otras utilidades, se emplea para la detección en multiplex de cadenas de ADN [131]. Se diferencia de los *arrays* en medios sólidos en que las sondas no se encuentran fijadas sobre una superficie sólida (*e.g.*, sobre una membrana de nylon o un portaobjetos de vidrio) sino que están unidas covalentemente a la superficie de microesferas de poliestireno y éstas, en suspensión en un buffer adecuado. Cada tipo de microesfera está rellena con una combinación de dos fluorógenos, rojo y naranja, en diez concentraciones posibles cada uno. Esto genera un panel de cien tipos distintos de microesferas. A cada una de ellas se acopla una sonda de identidad única. Un grupo concreto de microesferas, cada una con una sonda única acoplada a su superficie, forman un panel experimental. Un panel experimental completo se puede introducir en un pocillo de la placa de un citómetro, de manera que en cada pocillo podremos discriminar la identidad de una de las relaxasas amplificadas con los oligonucleótidos DPMT respecto de una serie de moléculas dadas.

Tabla 2.5.A. Listado de sondas empleadas en el *array* en suspensión.

Sonda ^a	Secuencia	Grupo Inc/Rep ^b	Grupo MOB ^c	Modelo ^d
F111	cttgttgcggcgatgctgaa	W	F11	R388
F112	agaggctgatggcaaaagtgtcag	-	F11	pCT14
F113	gtgggtgatgccccaaaagagcg	N1	F11	R46
F114	gaccgaccgacaacaagaagc	-	F11	pXCv38
F115	catagcaaccacctcgaccg	P9	F11	pBi709
F116	tgacaaggaacagggcacacgg	P9	F11	pWW0
F117	ggtaatgcccaagacctcgataagg	P9	F11	NAH7
F118	ctgatgcccaagcccgtcaac	P9	F11	pDTG1
F121	ctgggcagcatgggagaacg	FI/FII	F12	F/R100
F122	ccgacgggctgatctgagc	FII _S	F12	pSLT
F123	ggactcaggacgggccaac	FII _Y	F12	pMT
F124	cggaaactgctgaaaggaagctgc	FII _K	F12	pKPN3
F125	atatggatgctggctcggcagg	FV	F12	pED208
P11 α	gagagaagcccacgcggag	P1 α	P11	RP4
P11 β	agcagcccagcggcacc	P1 β	P11	R751
P11 δ	cggctaccaggatcatcagctg	P1 δ	P11	pEST4011
P11 γ	gccatcaggcgcggatg	P1 γ	P11	pQKH54
P1211	tcatacgtgaaatcactcggcct	I1 α /I1 γ	P12	R64/R621a
P1212	tcgggctgggtgaaatcagta	-	P12	pSC138
P1213	ctcttgaactctcaaacatcagctg	K	P12	R387
P1214	cccttgagctgtcaaacatcagctg	B/O	P12	pO113
P131	ggcatgtccgatacagctatgtg	L/M	P131	pCTX-M3
P31	aatcgccttgactgggtatcacgag	X2	P3	R6K
P32	cctaaccgctttgttctgga	X1/X3	P3	pOLA52
P422	gttttgcctgcatactgacg	U	P4	pRA3
P511	gggaggacgtgaaaaagtatg	ColE1	P51	ColE1
P512	cagacctgccaccgggaga	-	P51	pColK-K235
P513	ttctgatgccggactcgat	ColE1 _{TP}	P51	pTPqnrS-1
P514	gcttttgcctggtctggatg	-	P51	pAsa2
P515	caaggacaagctgatggacagc	ColE2	P53	pAsa1
H111	caggatgaagaagtgttcgccg	H11	H11	R27
H112	catcactcagaactgagaccaatcgg	H12	H11	R478
H121	gaacgcgtgacaatgagccg	A/C	H121	pSN254
H123	agggatcatcttgttccagtg	J	H121	R391
H124	caggccttagcatggcgtattg	T	H12	Rts1
H125	ctggatgggtgccttactacacc	P7	H12	pCAR1

a: Nombre de cada una de las sondas empleadas en el *array*.

b: Grupo Inc/Rep al que pertenecen la mayoría de plásmidos identificados por cada una de las sondas incluidas en la tabla. Clasificación derivada de [8, 11].

c: Grupo MOB al que pertenecen los plásmidos identificados por cada una de las sondas incluidas en la tabla. Tal como se describen en [1, 2].

d: Plásmidos modelo de cada uno de los grupos de plásmidos identificados por las sondas incluidas en la tabla. Se han utilizado como referencia los plásmidos modelo de grupos Inc/Rep, cuando los había o existía un grupo Inc/Rep definido.

Por otra parte, el *hardware* encargado del procesamiento de las muestras y las microesferas es un aparato semejante a un citómetro de flujo. Consiste en una plataforma móvil para cargar las muestras y en una unidad de lectura. La unidad de lectura consiste en un sistema hidráulico que mueve las muestras y las microesferas por el interior de la maquinaria (fluídica), en dos láseres, capaces de estimular la fluorescencia en los canales rojo y verde y por último, en un sistema de detección de fluorescencia con capacidad para discriminar las dos señales emitidas (estos dos últimos sistemas forman la óptica del aparato).

Diseñamos 36 sondas para identificar las relaxasas de los grupos F11, F12, P12, P131, P3, P4, P51, H11 y H12 (tabla 2.5.A.). Una gran mayoría de ellas tienen 22 pares de bases, tal como se recomienda en los protocolos de la casa comercial (Luminex Corp., TX) e hibridan con la cadena complementaria del amplicón obtenido por DPMT, aproximadamente sobre la mitad de la secuencia, también según las recomendaciones del fabricante.

Cada sonda fue acoplada a la superficie de una microesfera siguiendo el protocolo sin lavados recomendado por el fabricante (Luminex Corp., TX). En breve, centrifugamos 200 μ L de microesferas vírgenes (Bio-Rad, CA) y, una vez retirado el sobrenadante, acoplamos sobre su superficie los oligos aminomodificados en 5' y con un espaciador de 12 carbonos, por medio de la reacción espontánea catalizada por el reactivo EDC (Pierce). Esta reacción consiste en la formación de un intermediario inestable entre la superficie carboxilada de la superficie de la microesfera y el EDC, que es de la especie O-acylisourea. Este intermediario reacciona de manera espontánea con el extremo 5' amino-modificado de cada una de las sondas y forma un enlace covalente de tipo amida. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo dos veces, a fin de maximizar la cantidad de sonda unida a la superficie de las microesferas. Los restos de la sonda no acoplada a microesfera y de los reactivos sobrantes son eliminados por medio del lavado con Tween-20, mientras que el aglutinamiento espontáneo de las microesferas es reducido con el lavado con SDS.

Por último, se procede a la resuspensión de las microesferas, acopladas a sus sondas correspondientes y limpias, en Tris-base-EDTA (1:10, pH 8.0). Hemos de cuantificar las microesferas que hemos recuperado tras el proceso de acoplamiento de las sondas. Diluimos el stock de microesferas marcadas 1:100 en TE, pH 8.0 y 10 μ L de esta preparación se introducen en una cámara de Neubauer. Se enumeran las microesferas al microscopio, contando cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara. Calculamos la cantidad de microesferas presentes en la suspensión según la siguiente fórmula:

$$(Cantidad\ de\ microesferas) \times (1 \times 10^4) \times (factor\ de\ dilución) \times (volumen\ de\ resuspensión\ en\ mL)$$

Si todo se ha hecho correctamente, tendremos en la suspensión una cantidad aproximada de 5×10^5 microesferas por μ L. Tras enumerar las microesferas, es importante comprobar que se ha hecho bien la hibridación de la sonda sobre la superficie de las mismas. También es importante comprobar que cada sonda hibrida con su diana y que ésta no exhibe reactividad cruzada con otras sondas incluidas en el panel experimental. En ambos casos, se toman concentraciones crecientes de ADNcd control, marcado con biotina en su extremo 5' y se comprueba el nivel de señal de fluorescencia que se obtiene, tanto para la pareja sonda/microesfera que le corresponde como para el resto de componentes del panel experimental.

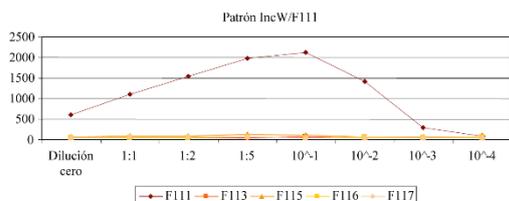


Figura 2.5.A. Curva de validación/patrón típica del array en suspensión. Se utilizó ADNcd marcado de la amplificación del gen *trwC* del plásmido R388 con los cebadores DPMT *F11-f* + *FI-r*. La sonda correspondiente a este gen es la denominada F111 (rojo oscuro), mientras que el resto del panel experimental MOB_{F11} consta de otras cuatro sondas (tonos amarillos). En ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias). Cada punto es la mediana del valor de fluorescencia de 100 microesferas individuales, unidas a una diana. En abscisas se representa las sucesivas diluciones del producto de amplificación marcado con biotina.

comienza a ser tan baja que afecta a la intensidad de la señal observada, que se reduce.

El proceso que seguimos para la identificación de una relaxasa por array en suspensión se describe en la figura 2.5.B. Amplificamos el ADN diana utilizando una pareja de cebadores DPMT con su reverso

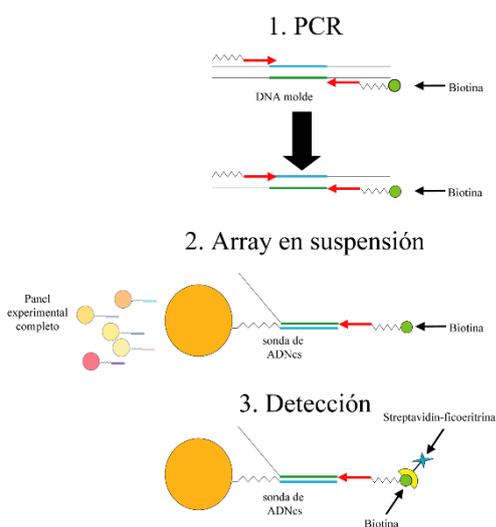


Figura 2.5.B. Flujo de trabajo del array en suspensión. Partimos de un amplicón producido con alguna de las parejas de oligos DPMT. Reamplificamos utilizando un oligo reverso modificado con biotina en 5' (flecha roja con esfera verde). El producto resultante se mezcla con el panel experimental utilizado, hibridándose con una de las secuencias diana en el mismo. A la mezcla se le añade estreptoavidina-ficoeritrina, que se une a la biotina, revelando su presencia. El láser detecta e identifica las microesferas por su emisión en el espectro del rojo, discriminando las rotas de las agregaciones múltiples y de los objetos individuales, que son los que contarán para el experimento. Otro láser detecta las microesferas que tienen una molécula de ADNcs hibridada a la correspondiente sonda, por medio de la emisión de la estreptoavidín-ficoeritrina en la longitud de onda del verde. La identidad del amplicón vendrá determinada por la identidad de la sonda asociada a la microesfera con la que hibridó la diana amplificada.

En la figura 2.5.A. vemos una típica curva de señal de fluorescencia, en este caso, la de la sonda F111, correspondiente a los plásmidos IncW. Se distinguen tres regiones dentro de la misma, la primera, con el ADNcd sin diluir, en la que la señal es baja. La alta concentración de la cadena complementaria secuestra la secuencia diana y reduce la señal observada. Este efecto decrece a la vez que se diluye la muestra, debido al aumento relativo de la concentración de la sonda respecto a la cadena secuestradora. En consecuencia, la señal detectada aumenta hasta llegar a un valor máximo. Esta zona, en general, se corresponde con diluciones en los rangos de 1:1 hasta 1:10². En la tercera zona, la cantidad de ADNcd

comienza a ser tan baja que afecta a la intensidad de la señal observada, que se reduce. Se diluye el producto en una proporción 1:10 para obtener una señal máxima, como ya hemos visto (figura 2.5.A.). Se elabora una mezcla de trabajo que contenga panel experimental completo de un grupo MOB concreto, cada una en una concentración final de 150 microesferas/μL. Incubamos 33 μL de esta mezcla con 10 μL de tampón TE (pH 8.0) y 7 μL del ADN marcado con biotina y (95°C, 5 minutos y 53°C, 20 minutos). Tras esta incubación, el ADN amplificado habrá hibridado con sonda correspondiente del panel experimental. A continuación, incubamos en presencia de estreptoavidina-ficoeritrina (SA-PE), producto con una alta afinidad por la biotina (53°C de temperatura, 10 minutos) en el soporte de 96 pocillos del Bioplex200. La muestra, hibridada a la pareja sonda-microesfera y a una molécula de SA-PE, pasa por un capilar y es sometida a la excitación de los dos láseres del Bioplex200.

La emisión de fluorescencia es captada por los detectores de la óptica y clasificada en **i**) objetos totales que pasan por delante del detector; esto incluye aglomerados de microesferas, microesferas rotas y microesferas individuales intactas, tanto con ADN hibridado en su sonda, como sin él; **ii**) microesferas individuales de los dos tipos indicados; y **iii**) microesferas con una molécula de

ADN hibridado a su sonda específica. El procesador reporta todos estos casos, pero los resultados finales que obtenemos se refieren únicamente a la tercera categoría clasificada. Calculamos las unidades de fluorescencia arbitrarias de cien casos (podemos indicarle que tome menos datos) y obtenemos el valor de su mediana (mediana de la intensidad de fluorescencia o MFI). Consideramos que hemos observado un positivo, identificando por tanto la relaxasa con un tipo concreto, cuando el valor de la MFI es al menos dos veces superior al de cualquier control negativo incluido en el experimento.

2.6. Colecciones de aislados

Analizamos cinco colecciones de aislados hospitalarios y una de aislados ambientales. Las colecciones hospitalarias se componían de aislados de enterobacterias patógenas, que tenían en común la resistencia frente a diferentes tipos de antibióticos, principalmente de los distintos grupos de β -lactamasas de amplio espectro (BLEEs) excepto, del grupo de las metalo- β -lactamasas (MBLs). Otra característica de las colecciones de aislados analizadas es que portan dichos determinantes de resistencia en plásmidos conjugativos y movilizables.

El procesado básico de cada muestra que llegó a nuestras manos fue el siguiente: siembra por agotamiento del inóculo original, en placas de LB suplementado con el antibiótico más adecuado. Una colonia puntual de las obtenidas fue propagada en medio líquido, con el mismo antibiótico y se dejó crecer un mínimo de 12 horas. A partir del cultivo saturado extrajimos ADN total por medio de la resina Instagene (Biorad, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. En breve, 25 μ L de cultivo saturado fueron lavados con 1 mL de agua dH₂O y resuspendidos en 25 μ L de resina por agitación en vórtex. Se incubó la mezcla a 56° C, durante 25 minutos, para inactivar las DNasas presentes en el medio o la célula. Transcurrida esta incubación se agita nuevamente la mezcla utilizando un vórtex. Para terminar, se incuban de nuevo las células durante 5 minutos a 100° C para que la membrana se rompa y se libere el ADN total al medio. El resto del cultivo fue conservado a -20° C, en glicerol peptona, una vez retirado el medio de cultivo agotado y el antibiótico por centrifugación. Las muestras de ADN fueron amplificadas con la batería de cebadores DPMT, siguiendo los protocolos de PCR optimizados a tal efecto. Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa, 2% p/v y teñidos con RedSafe (CHEMBIO). Las distintas relaxasas detectadas fueron identificadas por secuenciación del fragmento amplificado (Macrogen, Ámsterdam) o por el *array* en suspensión ya descrito (Luminex Corp.). Se buscaron los homólogos más próximos de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenidas por secuenciación, utilizando para ello el programa *online* BLASTp.

Colección de plásmidos ambientales, aislados del medio marino. Proporcionada por el grupo del Dr. Malte Hermansson, de la Universidad de Göteborg, Suecia, consta de 10 plásmidos obtenidos por aislamiento exógeno, es decir, aislados después de ser transferidos desde su huésped original a *P. putida* UWC1, desde la interfaz aire-agua en ambientes marinos, la columna de agua marina y el biofilm formado por distintas comunidades [132]. Son plásmidos que, por tanto, conjugan en medio líquido, bajo condiciones muy concretas. Además, fueron seleccionados por su resistencia a mercurio. El contenido en replicones se intentó determinar por hibridación con los mini-replicones descritos en [106], pero ninguno de los plásmidos aislados hibridó con ellas [132] y que no contienen ninguno de los replicones detectables por el ensayo de hibridación diseñado por [106]. Las distintas secuencias obtenidas de estos plásmidos por

el Dr. Malte Hermansson indican que 9 de los 10 poseen un replicón del grupo IncP1 (comunicación personal; también, [133]) mientras que el de pBFp1 es semejante al del plásmido IncW pSa [134].

Colecciones del Hospital Ramón y Cajal, Madrid. La Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, asociada al Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y dirigido por la Dra. Teresa M. Coque, nos proporcionó dos colecciones de aislados clínicos (serán llamadas TC1 y TC2 para diferenciarlas) recolectadas de pacientes ingresados, en el periodo entre 1988 y 2008, en el mencionado hospital. La colección TC1 constaba de 81 aislados bacterianos, todos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, productores de BLEEs (13 de ellos no presentaban este rasgo) y, además, MDRs. 66 de ellos eran transconjugantes obtenidos en el laboratorio de origen de las muestras y los 15 restantes eran los aislados originales, puesto que no se había podido demostrar su capacidad de movilización. Diferentes publicaciones del laboratorio de la Dra. Teresa Coque describen la mayoría de estos aislados clínicos en cuanto a los entornos genéticos de los mencionados genes de BLEEs y su epidemiología (SHV [135]; TEM [136-138]; y CTX [136, 139-143]).

La colección TC2 constaba de 54 aislados clínicos, todos ellos de la familia Enterobacteriaceae. De los 54, 38 eran transconjugantes, mientras que los 16 restantes eran los aislados originales. Todos ellos, excepto cuatro, producían BLEEs de distintos grupos, habiendo sido descritos en diversas publicaciones del grupo de la Dra. D^a Teresa Coque (SHV [135]; TEM [136, 142]; y CTX [135, 138, 141, 144]). De nuevo, los aislados proporcionados presentaban perfiles MDR, además de actividad β -lactamasa.

Los datos disponibles para ambas colecciones, consisten en la caracterización del replicón de los plásmidos de cada aislado utilizando las sondas descritas en [8, 10] (TC1 y TC2 presentan 16 aislados y 5 aislados sin grupo de replicación detectable, respectivamente), su número, sus tamaños, los genes de resistencia a β -lactamasas (y otros antibióticos) que portan, etc. Todas estas características se resumen en la tabla suplementaria 2.

Colección del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. Se trata de 53 aislados clínicos, seleccionados en función de la presencia de genes *ampC* en el mismo, recolectados entre los años 1999 y 2007 por el laboratorio del Dr. Ferrán Navarro. Los plásmidos contenidos en ellos fueron descritos por la Dra. Caterina Mata como sigue: todos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, mayoritariamente productores de beta-lactamasas del tipo AmpC, portando los genes responsables de dicho fenotipo en elementos móviles, capaces de conjugarse (excepto 12 cepas); se realizó una clasificación del contenido plasmídico por S1-PFGE, PBRT, hibridación *Southern* del amplicón, caracterización del entorno genético *ampC* y ensayos de conjugación [114].

En cuanto al gen *ampC* contenido en cada aislado, la clasificación previa indica que CMY, DHA y ACC son los genes más abundantes, mientras que el grupo de incompatibilidad más frecuente corresponde al complejo de replicación I1 (19 de 53 aislados), seguido del complejo F (16 de 53 aislados) [114]. De entre las 53 cepas analizadas, 7 no pudieron ser clasificadas por PBRT (un 13.2% de las muestras) aunque sabemos que cargan con plásmidos conjugativos. Los resultados se resumen en la tabla suplementaria 3.

Colección de la Universidad Autònoma de Barcelona. Recibimos un total de 16 aislados del laboratorio de la Dra. Montserrat Llagostera, del Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona. Estas cepas ya eran transconjugantes, que portaban entre uno y tres plásmidos, seleccionados en función de su contenido en genes de resistencia frente a β -lactámicos y el carácter

multirresistente (MDR) de su aislado original. Ninguno pudo ser asignado a un grupo de replicación utilizando el método de hibridación [106]. Otras características de cada plásmido determinadas por el laboratorio de origen fueron el número y tamaño y sus genes de resistencia concretos (CTX, SHV y TEM y resistencia a no β -lactámicos; tabla suplementaria 4).

Colección del Hospital Marqués de Valdecilla, Santander. La colección de aislados del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMdV) consiste en 76 aislados, diferenciadas en dos según su fenotipo de resistencia. La primera parte (llamada V1 en la tabla suplementaria 5) fue seleccionada por su fenotipo multirresistente y productor de β -lactamasas de espectro amplio (BLEAs). Consiste en 38 aislados, divididos en 13 donantes y 25 transconjugantes. La segunda parte de la colección (denominada V3 en la tabla suplementaria 4.) consiste en 19 cepas donantes y 19 de sus transconjugantes, cuya característica común es que son cepas MDR, no productoras de BLEAs. Todos los transconjugantes fueron producidos con *E. coli* J53 como cepa receptora. La caracterización de los plásmidos por parte del laboratorio de Microbiología del HUMV consistió en: determinación de su número y tamaño por medio de la extracción de su ADN utilizando el método de Kado y Liu [145], resistencia a antibióticos por microdilución, tanto en donantes como en transconjugantes [146]. Todos los aislados originales demostraron capacidad de producir transconjugantes y tanto aislados originales como transconjugantes fueron clasificados por medio del esquema PBRT [8, 10]. Todos los aislados fueron asignados a uno o más grupos REP [146].

Colección de cepas de Escherichia coli, aisladas de infecciones urinarias (Hospital de Umeå). Se nos proporcionaron 49 cepas, representativas del total obtenido en un estudio multicéntrico, realizado en la atención primaria de Suecia. En este estudio [147], se aislaron cepas de *E. coli* uropatógenas de mujeres que sufrían infecciones del tracto urinario comunitarias, no complicadas, antes y después de un tratamiento con pivmecillinam o un placebo. Estas cepas fueron caracterizadas según sus perfiles de PFGE y los perfiles obtenidos fueron comparados en función de la serie temporal a la que pertenecían y el tratamiento que esa paciente había recibido [147]. El laboratorio de la Dra. Ellen Zechner caracterizó 49 de estos aislados, representativos de sus respectivos perfiles de PFGE, en cuanto a su resistencia frente a distintos antibióticos, su capacidad para conjugar las mismas y los replicones plasmídicos contenidos en cada aislado. Únicamente se buscaron replicones del tipo F_{repB} , I1, HI1, W y X2 [8] y quizá a causa de esto, 16 de los 49 aislados carecen de un grupo de replicación definido. Los datos disponibles se resumen en la tabla suplementaria 6.

2.7. Secuenciación completa de relaxasas y plásmidos.

Secuenciamos los plásmidos cuyas relaxasas tuvieran menos del 95% de identidad con las moléculas de las bases de datos públicas, con particular interés en aquellos aislados positivos para la pareja de cebadores *F11-f+*/*F1-r*. La primera fase de la secuenciación utilizó una genoteca construida por digestión parcial con *Sau3AI* (New England Biolabs). El protocolo empleado es semejante al expuesto en el apartado *Elaboración de una genoteca por amplificación* de la sección 2.2., salvo porque se redujo la concentración final de enzima (de 0.3U/mL a 0.1U/mL) y el tiempo de reacción (de una hora a 30 minutos). Maximizamos así el tamaño de los fragmentos resultantes, al no ser capaz la cantidad de enzima suministrada de cortar todas las dianas presentes en la secuencia. Ligamos los fragmentos obtenidos en el vector pSU19, previamente digerido con el enzima *BamHI* (Fermentas) como ya hemos indicado. *BamHI* produce extremos compatibles con los extremos cohesivos que deja *Sau3AI*. Las construcciones fueron

transformadas en *E. coli* DH5 α y seleccionadas como ya hemos descrito. Las colonias blancas fueron seleccionadas y chequeadas como ya describimos para demostrar que portan un inserto. Purificamos los vectores con insertos de 1500 pares de bases o más y fueron secuenciados (Macrogen, Ámsterdam). La segunda fase de la secuenciación consistió en la generación de una genoteca por sonicación y su secuenciación por métodos tradicionales (Macrogen, Ámsterdam), de la que ya hemos hablado (sección 2.2.).

La tercera fase de la secuenciación consistió en el uso de un secuenciador GAIIX (Illumina Corp.), del Servicio de Secuenciación del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC). La preparación de la librería necesaria para el protocolo corrió a cargo de Carlos Revilla. Extrajimos ADN plasmídico por medio del Plasmid MaxiPrep Kit (Sigma) y se midió su concentración y calidad por medio del instrumento Nanodrop 2000 (Termo). Un microgramo de este ADN fue fragmentado por sonicación como ya se ha indicado, salvo porque fue sometido a 20 ciclos de sonicación de 30 segundos, a intensidad baja. Se volvió a comprobar la calidad y el tamaño de la muestra resultante corriéndola en un Bioanalyzer 2100 (Agilent), con el kit DNA 1000 (Agilent). El ADN así obtenido fue convertido en una librería compatible con una plataforma de secuenciación como la disponible. Utilizando el TruSeq DNA Sample Preparation kit (Illumina Corp.), los pasos dados fueron, en breve, los siguientes:

- Los fragmentos de ADN, de 300 pb, son convertidos en romos por medio de reacciones de relleno y actividad 3'-exonucleasa.
- Se añade una Adenina en posición 3' de cada cadena del fragmento, lo que prepara las secuencias para la ligación de los adaptadores.
- Se ligan los adaptadores. Cada pareja contiene una Timina en posición complementaria a la Adenina del paso anterior. Igualmente, incluyen ya la diana de secuenciación necesaria para el proceso de lectura y la secuencia *index* que identificará el origen de cada secuencia.
- Las librerías generadas son enriquecidas por amplificación.

Las librerías amplificadas se validaron en el Bioanalyzer 2100 (Agilent), usando el High Sensitivity DNA Chip Kit (Agilent). A continuación, se cuantificó el ADN obtenido en cada librería por *real time*-PCR y el termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las librerías con una buena calidad y cantidad de ADN fueron destinadas a secuenciación. El *flowcell* de la estación GAIIX fue preparado utilizando el TruSeq PE Cluster Kit v5-CS-GA (Illumina Corp.). Las condiciones de amplificación y lectura fueron las recomendadas por el fabricante. Finalmente, la extensión de la secuencia leída fue de 71 pares de bases.

SECCIÓN 3: RESULTADOS

3.1. Validación del método DPMT.

Familia MOB_F

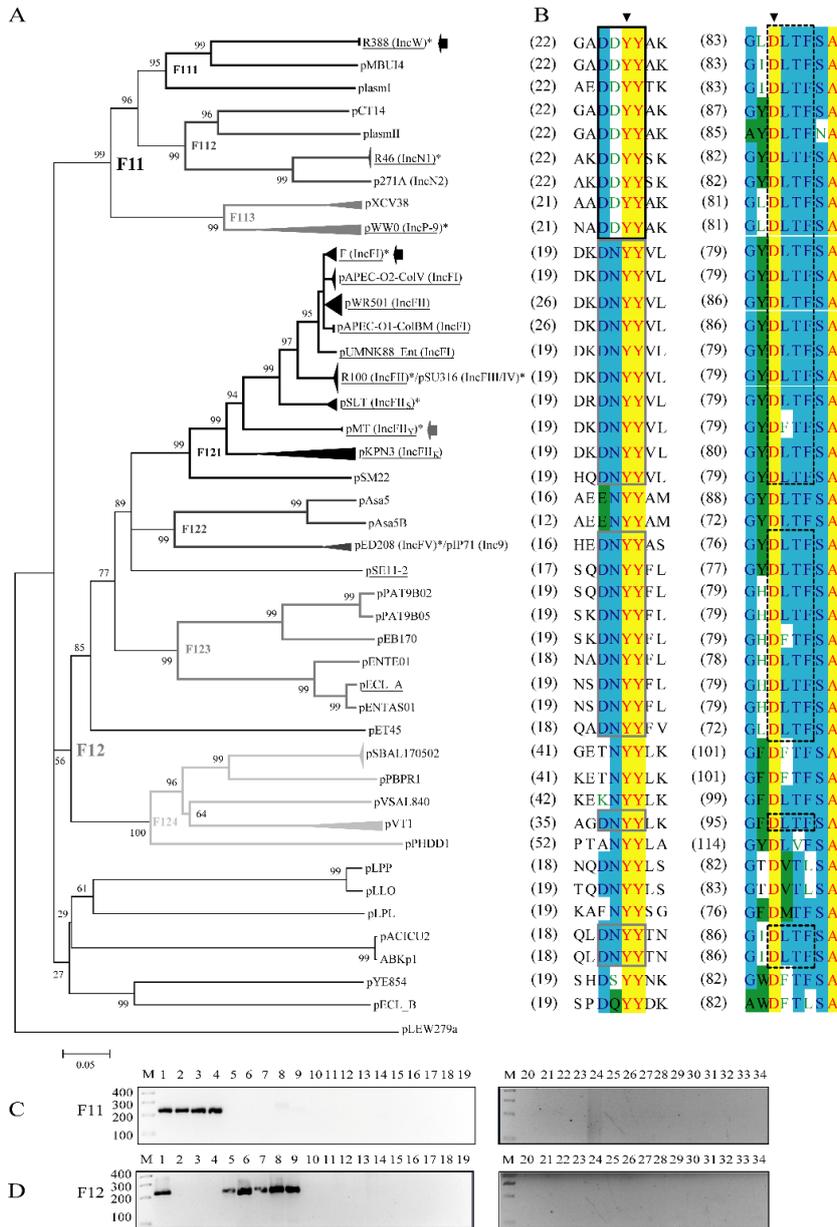
La familia MOB_F de relaxasas dentro de la clase γ -Proteobacteria se compone de 127 proteínas (a fecha de enero de 2012). Todas ellas forman parte de una única subfamilia, MOB_{F1} [73]. Dentro de ella, distinguimos tres sub-grupos de relaxasas relevantes. La rama F11 contiene tres subclados con relaxasas de plásmidos de tres grupos de incompatibilidad: el subclado F111 incluye plásmidos IncW (representado por TrwC_R388, nº de acceso CAA44853); el subclado F112, plásmidos IncN (TraI_R46, nº de acceso AAL13397) y el subclado F113, plásmidos IncP-9 (TraC_pWW0, nº de acceso NP_542915).

Cada uno de estos grupos dentro de MOB_{F11} aparece relacionado con un nicho ecológico y con una serie de rasgos fenotípicos concretos. Los plásmidos RepW y RepN, por ejemplo, son plásmidos de resistencia frente a antibióticos, comúnmente aislados en hospitales, explotaciones ganaderas y agrícolas tratadas con abonos de procedencia animal [148, 149]. Tanto los plásmidos RepW como los RepN son conjugativos, sirviendo de vehículos para la transmisión de resistencias a antibióticos principalmente.

También encontramos una serie de plásmidos cuyas relaxasas tienen ancestros comunes con las de los grupos F111 y F112, pero exhiben un alto grado de divergencia en las secuencias aminoacídicas. pMBUI4 es un plásmido ambiental, críptico, capturado por cruzamiento triparental sin selección en una laguna natural del arboretum de la Universidad de Idaho [150]. Los plásmidos plasmI y plasmII son nativos de *Xanthomonas albilineans* str. GPE PC73, un patógeno del xilema de las plantas vasculares [151]. El plásmido pCT14, nativo de *Pseudomonas* sp CT14, fue aislado del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales [152]. Por último, p271A es el primer plásmido del grupo IncN2, cuya principal característica es la producción de la carbapenemasa Bla_{NDM-1} [153]. pMBUI4 y plasmI se incluyen dentro de F111, mientras que plasmII y pCT14 lo están dentro de F112. Las evidencias experimentales sobre la capacidad conjugativa de estos elementos son variadas. El pCT14 carece de un sistema de secreción tipo 4 (T4SS) completo, lo que indicaría que, como mucho, podría ser movilizable. Tanto plasmI como plasmII poseen T4SS completos, con lo que podrían ser conjugativos. Por último, pMBUI4 es capaz de conjugar y de movilizar otros plásmidos [150].

El subgrupo F113 lo forman relaxasas de dos grupos de plásmidos. El primero está compuesto de nativos de bacterias patógenas de plantas, mientras que el segundo lo forman plásmidos asociados a la familia *Pseudomonadaceae*. El primer grupo de relaxasas pertenece a plásmidos asociados a la familia *Xanthomonadaceae*, menos pRSC35, nativo de *Ralstonia solanacearum* str. CMR15. pXcB, pXAC64 y pXCV38 portan genes de virulencia, cuyos productos son exportados a través de distintos sistemas bacterianos [154-157] o sistemas de secreción SecA-dependientes. Por otra parte, pRSC35 está relacionado con la inducción del crecimiento de la planta colonizada, aunque se supone que ocurre con el concurso de la bacteria hospedadora [158]. Todos poseen aparatos conjugativos completos y conjugan [155, 157-159].

Sección 3



(Página anterior) **Figura 3.1.A. Validación del método DPMT para la familia MOB_F.** A) Árbol filogenético de la familia MOB_F. Los triángulos al final de las ramas representan grupos de proteínas idénticas (>95% identidad). Una flecha negra indica el prototipo de cada subfamilia. Una flecha gris oscuro indica relaxasas amplificadas experimentalmente a pesar de tener una identidad menor del 100% en los 12 nt de la secuencia CORE. Los asteriscos indican relaxasas presentes en nuestra colección (ver tabla correspondiente en la Sección 1). Las relaxasas subrayadas pertenecen a plásmidos detectables por alguno de los métodos de PBRT [5-13]. B) Alineamiento de los motivos relaxasa utilizados para el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados. Código de colores: rojo sobre amarillo= residuos invariables; azul sobre azul= fuertemente conservados; negro sobre verde= similares; verde sobre blanco= escasamente similares; negro sobre blanco= no conservado. Las puntas de flecha negras indican los residuos clave que definen los motivos conservados en las relaxasas de este grupo. Los distintos rectángulos engloban los aminoácidos conservados que se utilizaron en el diseño del extremo 3' degenerado de cada pareja de oligos (*F11-f*, negro continuo; *F12-f*, gris oscuro continuo; *F1-r*, negro discontinuo). C) Amplicones obtenidos con los cebadores correspondientes a la subfamilia MOB_{F11} (*F11-f*+*F11-r*). Calle 1 pSU1588; 2, pSU4280; 3, pSU10013; 4, pSU10014; 5, pSU10017; 6, pSU10018; 7, pSU10021; 8, pSU316; 9, pSU10022; 10, pSU10010; 11, R751; 12, pSU10028; 13, pSU10029; 14, pSU10056; 15, pSU10055; 16, pSU10001; 17, pSU10012; 18, pSU10011; 19, pSU10009; 20, pSU4601; 21, pSU10006; 22, pSU10007; 23, pSU10064; 24, pSU10059; 25, pSU10008; 26, pSU10039; 27, pSU10040; 28, pSU10041; 29, pSU10004; 30, pSU10003; 31, pSU10043; 32, pSU4830; 33, pSU10002; 34, control negativo. Calle M, marcador de pesos moleculares, HyperLadder IV (Bioline) que indica incrementos de 100 pb. D) Amplicones obtenidos con los cebadores correspondientes a la subfamilia MOB_{F12}, sobre el mismo juego de controles que en (C).

Los plásmidos del grupo de Ps-P-9 están asociados con la familia *Pseudomonadaceae* y se caracterizan por presentar rutas de degradación de contaminantes aromáticos xenobióticos, como naftaleno y tolueno, entre otros, adquiridas por transposición y dispersadas por conjugación [160, 161]. Los plásmidos incluidos en este clado (y otros, como ellos relacionados con las rutas de degradación de aromáticos [162]) han demostrado su capacidad de transferencia experimentalmente [163]. Los plásmidos F111, F112 y F113 forman dos grupos diferenciados, que se sostienen de manera robusta en las frecuencias con que aparecen organizadas bajo la misma topología.

Se deduce claramente, pues, que las relaxasas F111 y F112 comparten un origen evolutivo común entre ellas más próximo en el tiempo que el nodo ancestral que conecta los tres clados. La distribución diferencial de los grupos de plásmidos descritos arriba, es decir, la preponderancia de F111 y F112 en animales de granja [149] y la de F113 en ambientes contaminados [164] y en diferentes ambientes vegetales [157], unida a las filogenias reconstruidas aquí, apuntan a una diferenciación en tres tipos de plásmido, colonizadores de bacterias de ambientes humanos, animales y vegetales o del suelo.

El segundo subgrupo dentro de MOB_F, F12, contiene mayoritariamente plásmidos del complejo de replicación F. En la literatura, éste ha sido dividido en siete subgrupos de incompatibilidad, que se relacionan con plásmidos α -hemolíticos. De todos estos subgrupos, IncFI e IncFII son los más comunes [149]. Paradigmas representativos de los grupos mayoritarios del complejo F, IncFI e IncFII serían el factor de fertilidad F (IncFI) y el plásmido de resistencia R100 (IncFII), respectivamente. Los plásmidos de este complejo se pueden catalogar también por los rasgos ecológicos que codifican en dos clases, de resistencia y de virulencia. Sus huéspedes son, principalmente, bacterias causantes de infecciones del tracto urinario e intestinal humano, así como en animales, principalmente aves [165-168].

La presencia simultánea de dos o más replicones en un mismo plásmido del complejo F, junto a la multitud de nuevos (e inclasificables) plásmidos de resistencia [149, 169] y de virulencia, en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* [166, 170], hizo necesaria la ampliación del sistema de clasificación por amplificación del replicón [11]. Aparecen así nuevos subgrupos IncFII, propios de géneros bacterianos concretos: *Salmonella* (FII_S), *Klebsiella* (FII_K), *Shigella* (FII_{Sh}) y *Yersinia* (FII_Y). Dentro de la filogenia de MOB_{F12} (figura 3.1.A.) estas relaxasas se agrupan formando grupos robustos, en función de la filogenia de sus huéspedes. Este conjunto tan diverso y numeroso se denominará F121 (figura 3.1.A.).

Fuera de F121 encontramos otras tres agrupaciones robustas de relaxasas. Primera, el grupo de relaxasas de plásmidos IncFV y Com9, que consta de cuatro relaxasas, de tres plásmidos. Todos estos plásmidos se relacionan con virulencia en animales (pUMNF_IncFV [171] y pAsa5 [172]) o en vegetales (pSW82; [173]). Este grupo de relaxasas recibe el nombre de F122 (figura 3.1.A.). Únicamente se ha demostrado la capacidad autotransmisible para los plásmidos pAsa5 y pED208. Segunda, seis relaxasas contenidas en sendos mega-plásmidos (>100 kb todos) de bacterias de los géneros *Erwinia*, *Pantoea* y *Enterobacter*, que cargan con genes para crecer en presencia de metales pesados y antibióticos. Forman el cluster F123 (figura 3.1.A.). Tercera y última, el grupo de relaxasas y de los plásmidos que las contienen, que forman el complemento plasmídico de diferentes aislados de *Shewanella baltica*, siete plásmidos de distintos tamaños, sin grupo de replicación conocido, que portan una serie de genes de resistencia a antibióticos y con capacidad teórica para conjugar. También encontramos dentro de este cluster un grupo de relaxasas de plásmidos nativos del género *Vibrio*. Forman el cluster F124 (figura 3.1.A.). Tanto *Shewanella* como *Vibrio* ocupan nichos marinos y son causantes de distintas enfermedades en organismos

Sección 3

marinos superiores e incluso zoonosis [174-178]. El resto de relaxasas se agrupan en grupos pobremente poblados, carentes de interés para el propósito de este análisis.

En función del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las 127 relaxasas MOB_{F1} (resumido en la figura 3.1.A.) elegimos la zona conservada alrededor de la segunda tirosina catalítica del motivo I (para los oligos *F11-f* y *F12-f*) y aquella posterior al residuo aspártico conservado del motivo II (para el *F1-r*, común a todas). Las partes consenso de los dos cebadores directos son completamente distintos, mientras que las partes “core” degeneradas se diferencian en una base (ver tabla 2.4.A.). Por ese motivo, no es excesivamente sorprendente que la pareja de cebadores *F12-f+F1-r* produzca una amplificación de la relaxasa TrwC de R388 (pSU1588). Sin embargo, no observamos la reacción contraria, es decir, amplificación de controles F12 cuando estamos validando la pareja *F11-f+F1-r* de oligos. Por otra parte, no se observan reacciones cruzadas con otras familias MOB cuando usamos estas dos parejas de cebadores (figura 3.1.A.).

Como se puede ver en la tabla 2.4.A., hubo que llevar el número de ciclos de amplificación para los oligos *F11-f+F1-r* hasta 30 para obtener un producto más abundante. Esta variación del protocolo, permitió la detección de nuevas relaxasas F11, como, por ejemplo, VirD2_pAA-TC1-69 (JN167247) y VirD2_pAA-TC1-30a (JN167248) (ver Sección 3.4) [114].

Familia MOB_P

La familia MOB_P incluye una amplia variedad de plásmidos y grupos de replicación e incompatibilidad, como el complejo IncP1 (IncP1 α , IncP1 β , IncP1 γ , IncP1 δ , IncP1 ϵ e IncP1 ζ), el complejo I (IncI1 α , IncI1 γ , IncK e IncB/O), IncL/M, IncQ2 (tanto α como β), IncG/IncP6, el complejo X (IncX1, IncX2, IncX3 e IncX4), IncU y plásmidos ColE1-*like*. Todos ellos forman grandes grupos filogenéticos que analizaremos de manera separada y para los cuales diseñamos parejas de cebadores que permiten su diferenciación inequívoca.

Subfamilia MOB_{P1}. Se compone de 77 relaxasas de plásmidos conjugativos (como el paradigmático RP4, del grupo IncP1 α [179, 180]) y también movilizables (como el IncP6 Rms149 [47]). MOB_{P1} contiene plásmidos de los complejos de replicación P1 y del complejo I, y plásmidos de los grupos IncL/M, IncQ2, IncP6 e IncQ3 (figura 3.1.B.). En general, las subdivisiones de MOB_{P1} coinciden con los grupos de replicación que acabamos de describir. La primera agrupación de *taxa* (P11) está formada por miembros del complejo de replicación P1, que consta de seis subgrupos (α , β , δ , ϵ , γ y ζ) basados en la semejanza de su proteína iniciadora de la replicación, TrfA [9, 133]. El subgrupo IncP1 α fue descubierto en 1969, en la Unidad de Quemados del Hospital de Accidentes de Birmingham, en cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* y *E. aerogenes* [97, 181].

El subgrupo IncP1 β está representado por la relaxasa del plásmido R751 [182, 183] y se compone de 13 moléculas que, a su vez, se encuentran robustamente divididas en dos *cluster* de *taxa* (figura 3.1.B. [133]). Los plásmidos de los grupos α y β contienen genes de resistencia a antibióticos y a metales pesados por igual, habiendo sido aislados tanto en hospitales como del medio ambiente (particularmente, suelos y aguas contaminados).

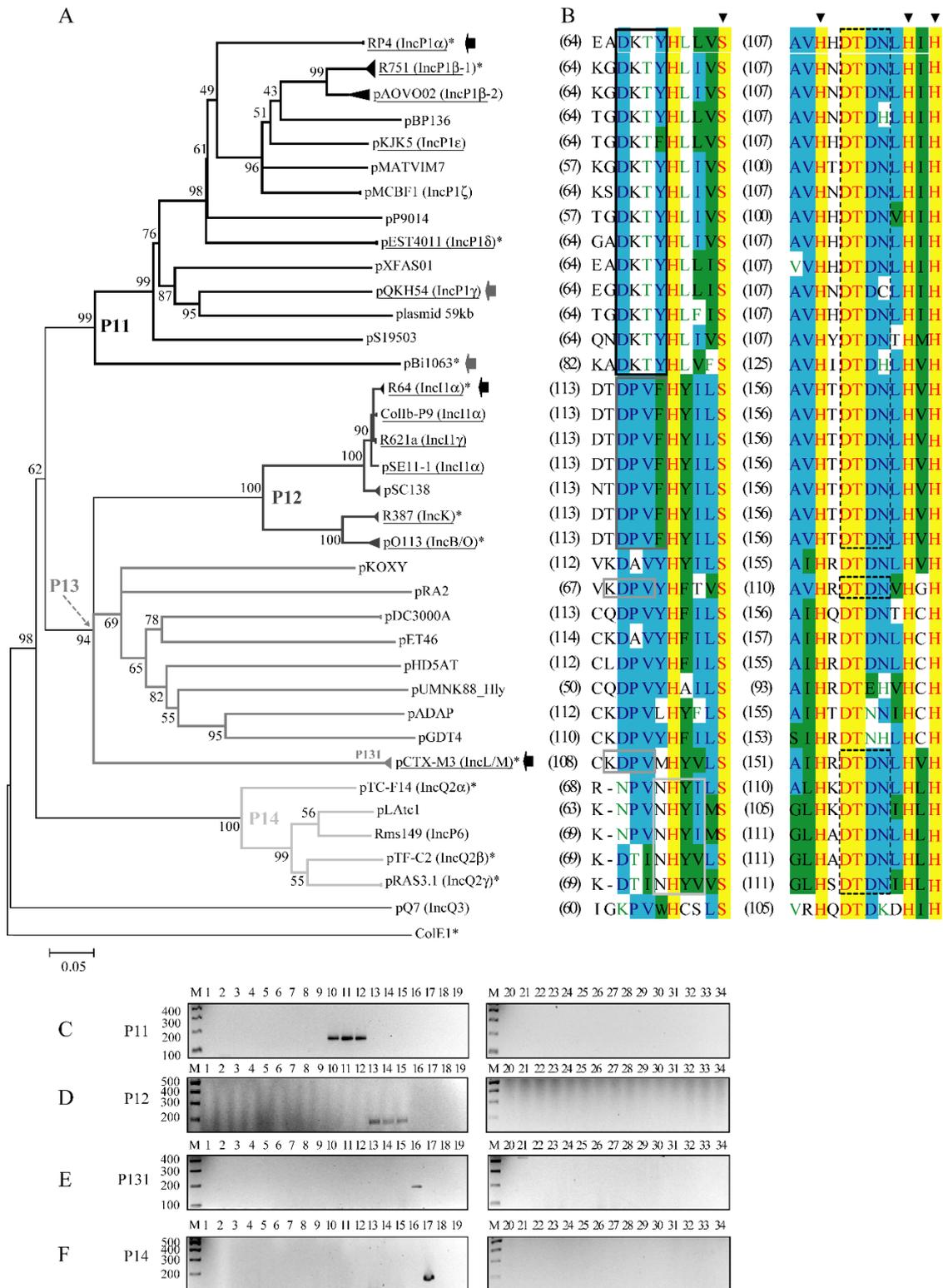


Figura 3.1.B. Validación del método DPMT para la familia MOB_{P1}. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_{P1}. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*P11-f*, negro continuo; *P12-f*, gris oscuro continuo; *P131-f*, gris continuo; *P14-f*, gris claro continuo; *P1-r*, negro discontinuo). C) Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos correspondientes a la subfamilia MOB_{P11} (*P11-f+P1-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P12} (*P12-f+P1-r*). E) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P131} (*P131-f+P1-r*). F) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P14} (*P14-f+P1-r*). Símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

Los plásmidos de los subgrupos δ , ϵ , γ y ζ provienen de suelos y aguas contaminadas [133, 184-186]. Contienen genes de resistencia a antibióticos, metales pesados y xenobióticos [187], integrados en un chasis genético común, altamente conservado y estable en multitud de huéspedes [9, 133, 187-189].

El segundo *cluster* de MOB_P se denomina P12 (figura 3.1.B) y contiene las relaxasas de los plásmidos del complejo de replicación I (IncI1 α , IncI1 γ , IncK e IncB/O) excepto del grupo IncZ. Los plásmidos IncZ son conjugativos, pero no conocemos la secuencia completa de ninguno de ellos, con lo que no se puede afirmar con seguridad a qué familia pertenecen sus relaxasas [190]. Los miembros de este complejo de replicación tienen un control del inicio de la replicación de origen común, basado en la regulación de la expresión del gen codificante del iniciador de la replicación, por medio de la interacción del ARNm de éste con un ARN interferente, ARNI [191]. Mutaciones en sus secuencias hicieron que el grupo de replicación se diversificara para dar lugar al complejo que conocemos hoy día [100, 191].

Además del replicón común del complejo I, los plásmidos con relaxasas del *cluster* P12, contienen replicones relacionados con los del grupo IncFIIA. En algunos casos, éste es el único replicón que tienen estos plásmidos (*e.g.*, pAA86L [192]; y pSC138, pese a lo expresado en [193]). Este tipo de plásmido podría ser el resultado de la cointegración o la recombinación de dos plásmidos, uno I1 y otro FIIA, en el que el plásmido resultante ha perdido el replicón tipo I. En el caso concreto del plásmido pCoo, la recombinación de dos plásmidos, uno I1 y otro FIIA, da lugar a una quimera con dos replicones [194].

Los plásmidos del complejo I cargan con genes accesorios de resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos y quinolonas (entre ellos, CTX-M-14, TEM-52, *armA* y *qnrA1*; ver [149] y las referencias allí dentro) y determinantes de virulencia [142, 149, 190, 195]. Su capacidad conjugativa los convierte, por tanto, en excelentes vehículos para la propagación de estas características fenotípicas. Su abundancia y variabilidad en *Enterobacteriaceae* ha hecho necesario desarrollar el método PBRT hasta convertirlo en un análisis de secuencia en *locus* múltiples (*multi locus sequence type* o pMLST) [109].

Todos los plásmidos IncI1 forman un grupo separado y robusto dentro de la unidad P12 (figura 3.1.B.). Por otro lado, los grupos señalados en dicha figura como IncK e IncB/O contienen plásmidos de otros grupos de replicación del complejo I. Esto indicaría que, dada la facilidad con la que los plásmidos de este complejo de replicación evolucionan para formar nuevas variantes, se ha producido recombinación entre secuencias homólogas. Esto habría permitido el intercambio de módulos genéticos completos, originándose topologías heterogéneas, como la observada.

Los plásmidos P12 están relacionados con la expansión de distintos grupos de genes de resistencia. Particularmente, el gen de la variante CTX-M-14 se encuentra asociado a plásmidos de tipo IncK, expandiéndose con ellos, tanto en España como en Francia, aunque con excepciones [142, 149]. Los plásmidos de tipo IncB/O no se asocian con ningún gen de resistencia concreto, aunque en casos concretos, como el plásmido de multirresistencia pR3521 podemos encontrar una gran cantidad de genes accesorios de resistencia en su secuencia [196]. Todos los datos de asociación entre plásmidos P12, grupos de replicación y genes accesorios de resistencia, ponen de manifiesto la importancia de este grupo en la propagación de genes de resistencia [149].

El tercer gran grupo que se forma es MOB_{P13}, del que destacamos el subgrupo P131 en la figura 3.1.B. Los plásmidos contenidos en este *cluster* pertenecen al grupo IncL/M. En general, éstos plásmidos se relacionan con la dispersión de distintas β -lactamasas de amplio espectro (BLEEs), entre ellas CTX-M-3, SHV-5 y IMP-4, siempre en hospitales, en distintos y distantes ámbitos geográficos [149]. A menudo, esta asociación se relaciona también con la presencia y propagación del gen de resistencia a aminoglicósidos *armA* [149]. Por último, los genes de resistencia a quinolonas de algunas variedades *qnr* (B1, B2, B4, B19 y S1), también se propagan utilizando plásmidos IncL/M [149]. Los otros nueve plásmidos de P13 carecen

de grupo de replicación caracterizado y forman un grupo insuficientemente poblado para estar bien resuelto, de manera que no se incluyeron en el estudio (figura 3.1.B.).

El último grupo de relaxasas lo forman las agrupadas bajo el nombre de P14. Son relaxasas propias de los plásmidos movilizables IncQ2 e IncP6, que carecen de sistema de secreción propio [47]. Existen varios sistemas de secreción tipo 4 (T4SS) asociados con la movilización de los plásmidos IncQ2: pRAS3.1 y pRAS3.2 pueden ser movilizados por el plásmido pRAS1, del grupo IncU [197]; pTC-FC2 y pTC-F14 son movilizados por RP4 (IncP1 α) y otros plásmidos del complejo P [47]; y Rms149 (IncP6), comparte la organización del backbone de los plásmidos anteriores y es movilizado también por el T4SS del grupo IncP1 [198]. Exceptuando pTC-FC2 y pTC-F14, estos plásmidos son portadores de genes de resistencia a antibióticos.

En la figura 3.1.B. se pueden observar las zonas escogidas para diseñar los oligonucleótidos DPMT para MOB_{P1}. Utilizamos los aledaños del motivo II para los cebadores directos en todos los casos y el motivo III para el reverso. En total, cuatro parejas de cebadores (tabla 2.4.A.) amplifican por completo los cuatro grupos de relaxasas principales de MOB_{P1} (figuras 3.1.C.-F.). La pareja *P11-f+P1-r* produjo amplicones del tamaño esperado, sin que se observaran reacciones cruzadas con ninguno de los controles utilizados. La pareja de oligos *P12-f+P1-r* produjo muy poca cantidad de producto de amplificación bajo condiciones estandar de PCR. Por tanto, hubo que incrementar la cantidad de polimerasa, la temperatura de hibridación y el número de repeticiones del ciclo de amplificación (tabla 2.4.A.) para paliar estos problemas.

La pareja *P131-f+P1-r* produjo una amplificación inespecífica del control MOB_{P52}, pSU10006 (*mobA_p9555*; tabla 2.B.) de 500 pares de bases. Ésta es mucho mayor que el obtenido para el control positivo de esta pareja, lo que permite discriminar un falso positivo. También, en el protocolo para *P131-f+P1-r* redujimos el tiempo de extensión para eliminar una serie de productos inespecíficos ligeramente mayores que el esperado en los controles positivos.

Subfamilias MOB_{P3} y MOB_{P4}. Estas dos subfamilias constan de 21 miembros (tabla suplementaria 1). MOB_{P3} (16 miembros) se compone de plásmidos del complejo de replicación X, cuyo principal representante es R6K (IncX2; [199]). Los miembros del complejo X se caracterizan por la ausencia de

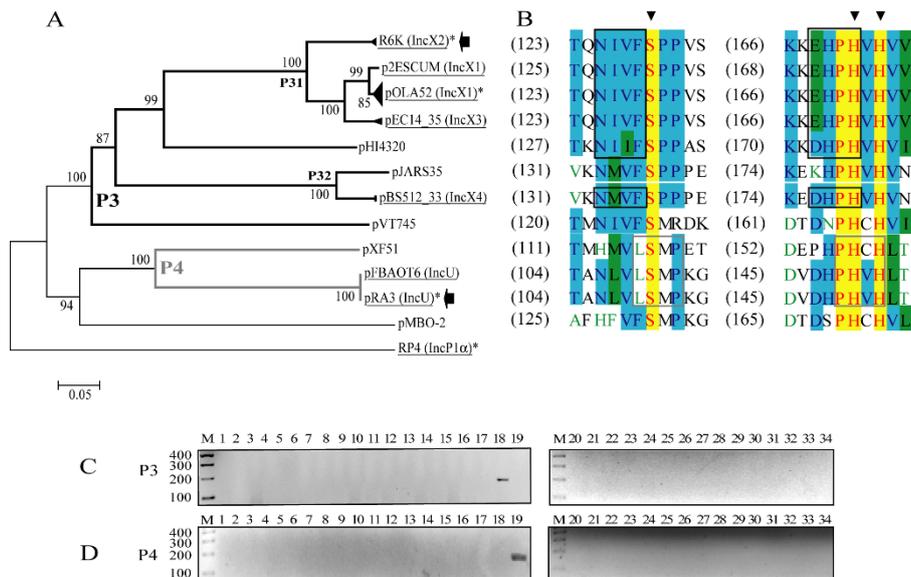


Figura 3.1.C. Validación del método DPMT para la familia MOB_{P3/P4}. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_{P3/P4}. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*P3-f+P3-r*, negro continuo; *P4-f+P4-r*, gris oscuro continuo). C) Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos correspondientes a la subfamilia MOB_{P3} (*P3-f+P3-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos correspondientes a la subfamilia MOB_{P4} (*P4-f+P4-r*). Símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

hibridación de la sonda IncX2 [106] con los replicones de los otros subgrupos [105]. De la misma manera, la amplificación PBRT de la proteína iniciadora de la replicación (Pir) de este grupo de plásmidos es válida solo para los plásmidos IncX2 por haber sido diseñada copiándose al modelo de este grupo, R6K [13]. El resto de plásmidos P3 están englobados en las clases X1, X3 y X4 (figura 3.1.C.). Estas subclases aparecieron por comparación entre las secuencias de los plásmidos IncX1, IncX2 y diferentes plásmidos IncX-like, aislados a lo largo del tiempo. Para éstos se diseñaron sondas que amplifican específicamente sus relaxasas [13].

Los plásmidos MOB_{P3}/Complejo X están presentes en patógenos oportunistas, a los que proporcionan resistencias múltiples y factores de virulencia, como fimbrias de adherencia [200]. También se sabe que los plásmidos del complejo X pueden formar cointegrados con plásmidos de virulencia tipo F en *Salmonella* [13], como ocurre con los plásmidos pOU1115 [201] y p3246_74 [202]. Podemos llamar P31 al grupo que contiene los plásmidos X2 (R6K), X1 y X3 (pOLA52 y pEC14_35, respectivamente [200]).

El *cluster* P32 está formado por cuatro plásmidos, tres de los cuales (pBS512_33 (NC_010657), pUMNF18_32 [171] y pJIE143 [203]) pertenecen al grupo IncX4. Sus relaxasas son prácticamente idénticas y forman un grupo homogéneo dentro de P32. La relaxasa del cuarto plásmido, pJARS35 [204], que no es de este grupo Inc, forma su propia rama dentro de P32. Los plásmidos pJARS35 y pJIE143 cargan con genes de resistencia a antibióticos o a metales pesados, mientras que los plásmidos pBS512_33 y pUMNF18_32 parecen ser crípticos.

Las relaxasas MOB_{P4} en γ -Proteobacteria se reducen a tres moléculas (figura 3.1.C.), dos de ellas en plásmidos conjugativos clasificados como IncU. Estos son pRA3 de *Aeromonas hydrophila* [205] y pBFAOT6 de *A. punctata* [206]. pRA3 es el modelo del grupo de replicación IncU y de la subfamilia MOB_{P4}. Es un plásmido de amplio rango de huésped, relacionado con la resistencia a quinolonas en aeromonadales [149, 205]. pRA3 es un mosaico genético, con módulos semejantes a otros que se encuentran en plásmidos MOB_{P4}, nativos de otras clases de Proteobacteria (módulo de replicación y de transferencia horizontal) o de los grupos IncP1 α y IncP1 β (módulo de mantenimiento estable) [205].

Las subfamilias MOB_{P3} y MOB_{P4} tienen cada una su propia pareja de oligonucleótidos para amplificar todos sus miembros. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos (figura 3.1.C.) identificó el motivo conservado II como ideal para diseñar el oligonucleótido directo de ambas subfamilias. A pesar de que tanto P31 como P32 tienen dos secuencias aminoacídicas distintas (NIVF y NMVF, respectivamente) los residuos isoleucina y metionina permitieron diseñar un único oligonucleótido directo P3-f con 12 grados de degeneración (tabla 2.4.A.). El cebador directo P4-f se diseñó incluyendo esta vez el residuo serina conservado del motivo II. Sus seis posibles codones compensan la poca variación de los codones de los residuos adyacentes, sin incrementar en exceso la degeneración del cebador. Los cebadores reversos hibridan sobre la segunda histidina (sonda P3-r) y sobre la segunda y la tercera histidinas (sonda P4-r) del motivo conservado III. Ambas parejas de sondas amplifican específicamente sus controles positivos y no producen reacciones cruzadas con relaxasas de otras familias MOB (figura 3.1.C.).

Cuando el plásmido amplificado procede de una *Salmonella enterica*, la amplificación con la pareja de iniciadores P4-f+P4-r produce un amplicón del mismo tamaño que el esperado, pero que corresponde a un gen de su cromosoma. Este efecto se elimina cuando programamos un protocolo de amplificación tipo *touchdown* [120]. Solo empleamos este tipo de protocolos para plásmidos nativos de *S. enterica*, por lo que no se recoge en la tabla resumen de los cebadores DPMT (tabla 2.4.A.).

Sección 3

Subfamilia MOB_{P5}. La figura 3.1.D. muestra la filogenia obtenida para esta amplia familia de relaxasas. MOB_{P5} está compuesta por 60 relaxasas de plásmidos no conjugativos, movilizados por diversos T4SS (evidencias experimentales para F111/IncW, F121/IncFI, P11/IncP1, P121/IncI1α [207], datos que sugieren esta misma actividad para P122/IncK, P123/IncB/O y H12/IncA/C [10] y nuestros propios datos; ver Sección 4). Las relaxasas MOB_{P5} conservan un residuo tirosina catalítico en el motivo I y una serina (junto a un glutámico o aspártico) en el motivo II. Pero las relaxasas MOB_{HEN} [1] poseen un motivo III divergente del 3H consenso, que contiene una histidina, un ácido glutámico y una asparagina. Se ha visto que cumpliendo la misma función, el motivo HEN es más eficiente que el 3H [208]. El resto de relaxasas MOB_{P5} (un grupo minoritario) presentan un motivo 3H consenso.

Se definen dos parejas de cebadores para los plásmidos dentro de MOB_{P5}, oricolE y oricolE_{TP} [10]; un análisis visual de la secuencia del replicón de un plásmido ColE1_{TP} permite observar la presencia en su replicón de dianas de amplificación tanto para la pareja de sondas ColE1_{TP} como para la de ColE1 (tabla suplementaria 1).

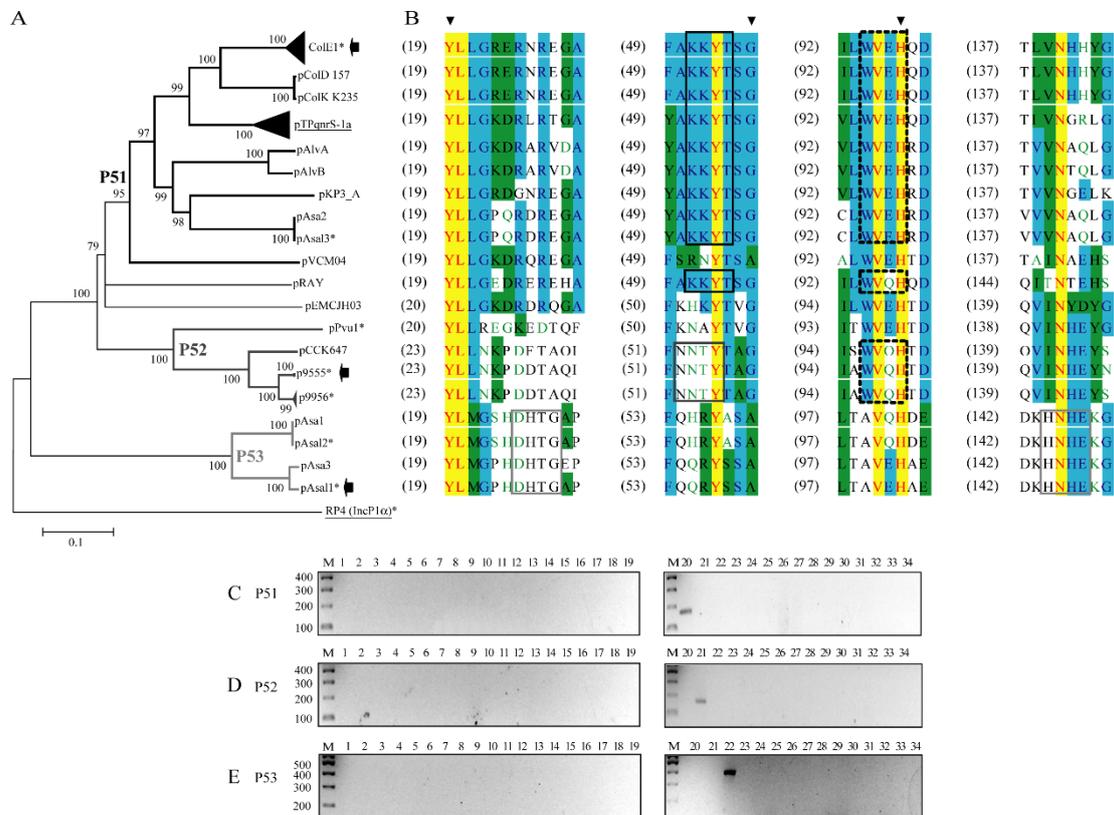


Figura 3.1.D. Validación del método DPMT para la familia MOB_{P5}. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_{P5}. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*P51-f*, negro continuo; *P52-f*, gris oscuro continuo; *P53-f+P53-r*, gris continuo; *P5-r*, negro discontinuo). C) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P51} (*P51-f+P5-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P52} (*P52-f+P5-r*). E) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{P53} (*P53-f+P53-r*). Símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

La filogenia MOB_{P5} se divide en tres grupos robustos (figura 3.1.D.), el primero de los cuales (P51) agrupa a todas las relaxasas de plásmidos tipo ColE1. Estos son los únicos que podrían ser clasificados por medio de PBRT, como ya hemos dicho [10]. Junto a ellos hay relaxasas propias de plásmidos sin cebadores que detecten sus replicones particulares: los plásmidos pAlv, pKP3-A, pAsa2 y pAsal3. Estos cinco plásmidos forman un grupo propio, definido y robusto, con valores de nodo por encima de 95 (ver figura 3.1.D.). Los plásmidos P51 se relacionan con la transferencia de resistencias a quinolonas

Sección 3

y aminoglicósidos mediada por plásmidos [209, 210] y con la dispersión de BLEEs variadas, como los genes *bla*_{CTX-M-17} [211] o *bla*_{CMY-31} y *bla*_{CMY-36} [212].

El segundo grupo de relaxasas (P52) engloba 13 plásmidos divididos claramente en dos grupos, uno formado únicamente por el plásmido pPvuI [213] y otro que contiene a los otros 12 restantes plásmidos. Éstos provienen en su mayoría de aislados de *Actinobacillus* sp. y *Pasteurella* sp., se relacionan con la transmisión de resistencias varias, en general frente aminoglicósidos, sulfonamidas y tetraciclinas, entre agentes causales de varias enfermedades de animales de granja [214-216]. Existen pocas evidencias sobre qué plásmidos pueden movilizar a los miembros de P52, aunque algunos artículos apuntan al plásmido P111/IncP1 α RP4 como capaz de movilizar al menos los plásmidos p9555 y p9956 [217] o al plásmido conjugativo pEC1591 como movilizador del plásmido pCCK647 [214].

El tercer grupo de relaxasas MOB_{P5} agrupa las moléculas no-MOB_{HEN} de esta subfamilia (es decir, relaxasas con un motivo III clásico, de tipo 3H). Se trata de las relaxasas de los plásmidos pAsa1, pAsa2, pAsa3 y pAsa11, nativos de *Aeromonas salmonicida* [218, 219]. Éstos son plásmidos clasificados como tipo ColE2 (pAsa1, pAsa11 y pAsa3) y tipo ColE1 (pAsa2) en función de las semejanzas de sus sistemas de replicación respectivos [218, 219]. Los cuatro carecen de un T4SS, de manera que deben ser movilizables, aunque no se han realizado experimentos al respecto. Algunos autores han sugerido que estos pequeños plásmidos pueden cohabitar con los plásmidos pAsa4 y pAsa5 en *A. salmonicida* A449. Éstos sí cargan con T4SS completos y podrían actuar como elementos movilizadores para pAsa1, pAsa2, pAsa3 y pAsa11 [172, 218]. Finalmente, su carga genética consiste en toxinas, que podrían ser exportables a través del T3SS del huésped (pAsa1 y pAsa11) y sistemas de adicción molecular (pAsa1 y pAsa3) [218, 219].

El alineamiento de las regiones clave de las relaxasas MOB_{P5} se muestra en la figura 3.1.D. Dada la semejanza entre las relaxasas de P51 y P52 pudimos utilizar una única sonda reversa, *P5-r*, para amplificar estos dos subgrupos. Utilizamos el primer residuo histidina del motivo III y los tres aminoácidos precedentes para diseñar la parte degenerada de la sonda, con 16 grados de degeneración (tabla 2.4.A.). Las dos sondas directas que amplifican P51 y P52 se diseñaron sobre el motivo II, de interacción con el ADN. Ambas sondas presentan 8 grados de degeneración. Ninguna de las dos parejas de sondas resultantes produjo amplificación cruzada de los controles de otras familias MOB ni del resto de controles MOB_{P5} (figura 3.1.D.).

Con la pareja de sondas *P51-f+P5-r* y la *P52-f+P5-r* hubo que reducir el tiempo de extensión de 30 a 20 segundos por ciclo para eliminar productos de amplificación inespecíficos e incrementar el número de repeticiones del ciclo de amplificación hasta 30 para obtener una cantidad adecuada de producto de PCR. La pareja de cebadores que amplifica las relaxasas MOB_{P53} se diseñaron inmediatamente a continuación del motivo I (el directo) y en una zona conservada a 30 aminoácidos de distancia del final del motivo III (el reverso).

Estas sondas tienen, respectivamente, 16 y 8 grados de degeneración y amplifican sus controles de manera específica, en una reacción en la que únicamente incrementamos el número de ciclos de amplificación a 30. No observamos amplificaciones cruzadas sobre relaxasas de otros grupos MOB, igual que ocurría con las dos parejas de cebadores anteriores.

Familia MOB_Q

La familia MOB_Q en γ -Proteobacteria está formada por 43 miembros, divididos en dos *clusters* (figura 3.1.E.). La primera subdivisión la componen los *clusters* MOB_{Q11} y MOB_{Q12}. El primero de éstos contiene todas las relaxasas propias de plásmidos IncQ1, cuyo modelo y referencia es RSF1010 [220], así como los plásmidos R300B, R1162, pSRC15 y pTY474p3, que son prácticamente idénticos a RSF1010 [47]. Los plásmidos IncQ1 son movilizados principalmente por RP4 y otros miembros de su familia (IncP1 α), pero también por los T4SS de plásmidos IncI α , IncL/M, IncX, IncF e IncFVI (aunque con menor eficacia), y apenas por los de IncN e IncW [1, 119]. Aún a pesar de su necesidad de ser movilizados para transferirse, los plásmidos MOB_{Q11}/IncQ1 son capaces de replicarse en una amplísima variedad de huéspedes gracias al diseño de su módulo de replicación, consistente en tres proteínas (una primasa, una helicasa y una proteína de interacción con el ADN) y un origen de replicación en *cis*. Este esquema permite que estos plásmidos repliquen de manera más independiente de la maquinaria del huésped [47]. Por último, los plásmidos MOB_{Q11}/IncQ1 están asociados a resistencias contra estreptomicina y sulfonamida, tanto en patógenos animales como humanos [102, 221].

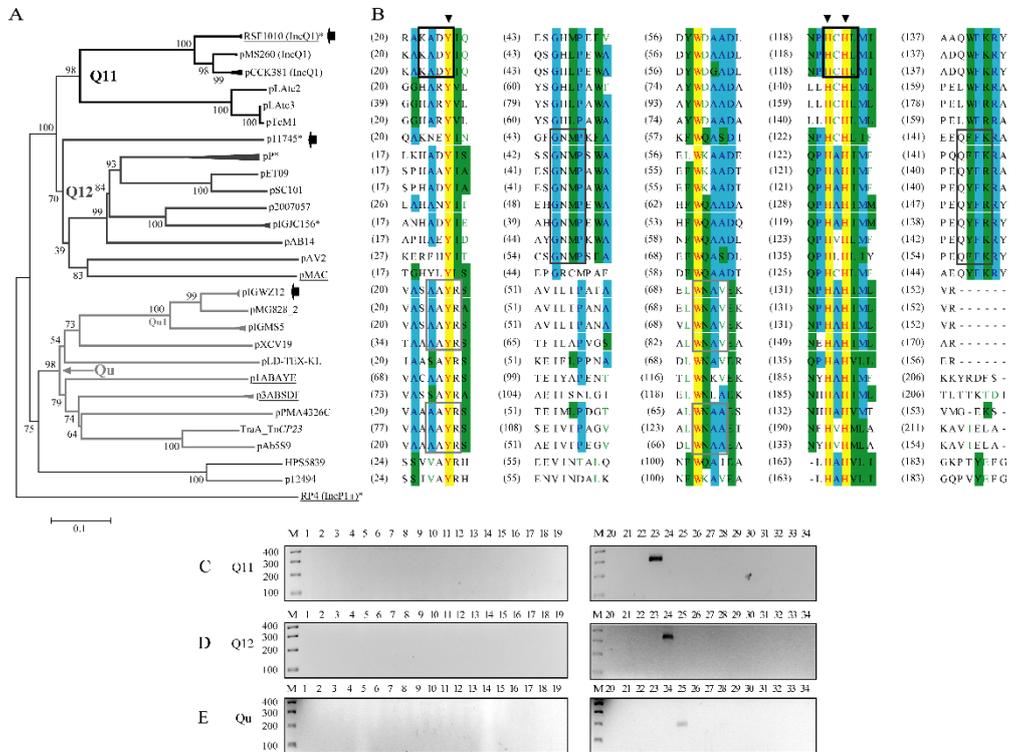


Figura 3.1.E. Validación del método DPMT para la familia MOB_Q. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_Q. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*Q11-f+Q11-r*, negro continuo; *Q12-f+Q12-r*, gris oscuro continuo; *Qu-f+Qu-r*, gris continuo). C) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{Q11} (*Q11-f+Q11-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{Q12} (*Q12-f+Q12-r*). E) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{Qu} (*Qu-f+Qu-r*). Símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

Dentro de Q11 podemos distinguir un nuevo grupo de plásmidos, formado por pLAtc2, pLAtc3 y pTcM1. Los tres plásmidos son nativos de *Acidithiobacillus caldus* [222, 223], con genes accesorios de resistencia a metales pesados, pero ninguno responde al prototipo de plásmido IncQ1 definido por Loftie-Eaton y Rawlings en su extensiva revisión [47].

El segundo grupo filogenético lo denominamos Q12 (figura 3.1.E.). Está formado por dos grupos bien diferenciados. Los plásmidos que contienen estas relaxasas son, en su mayoría, originarios de bacterias patógenas humanas y animales; algunos contienen genes de resistencia a antibióticos (gen *tetA* en pSC101 o *qnrD* en p2007057) [224, 225] mientras que otros son crípticos (como el plásmido pP; NC_003455). En

Sección 3

cualquier caso, todos son menores de 10 kb, excepto p838C-R1 (HQ201416). Éste tiene aproximadamente 30 kb y carga con una gran inserción que le confiere multirresistencia, pero es una excepción. Por lo demás, estos plásmidos no tienen un grupo de replicación asignado, (excepto pSC101, un IncQ y pP, quien tiene una RepA de tipo ColE2, típica de algunos plásmidos MOB_{P53}). Se desconoce si pueden ser movilizables (excepto, otra vez, del plásmido pSC101, de quien se supone que es capaz de ser movilizado por los mismos T4SS que RSF1010 y R1162) [226].

En la rama MOB_{Qu} (figura 3.1.E.) encontramos un subgrupo de relaxasas altamente relacionadas (relaxasas de los plásmidos pSE11-6 [227], pIGWZ12 [228], pSMS35_4 [229], unnamed [nº de acceso NZ_DS999514], pMG828-2 [NC_008487], pIGMS5 [NC_010883], pO26-S4 [NC_011228] y ColE9-J [230]), de plásmidos nativos de *E. coli*, menores de 7 kb en tamaño y en general crípticos [227, 228]. Todos carecen de un grupo de replicación detectable por PBRT y de datos sobre los T4SS que podrían movilizarlos.

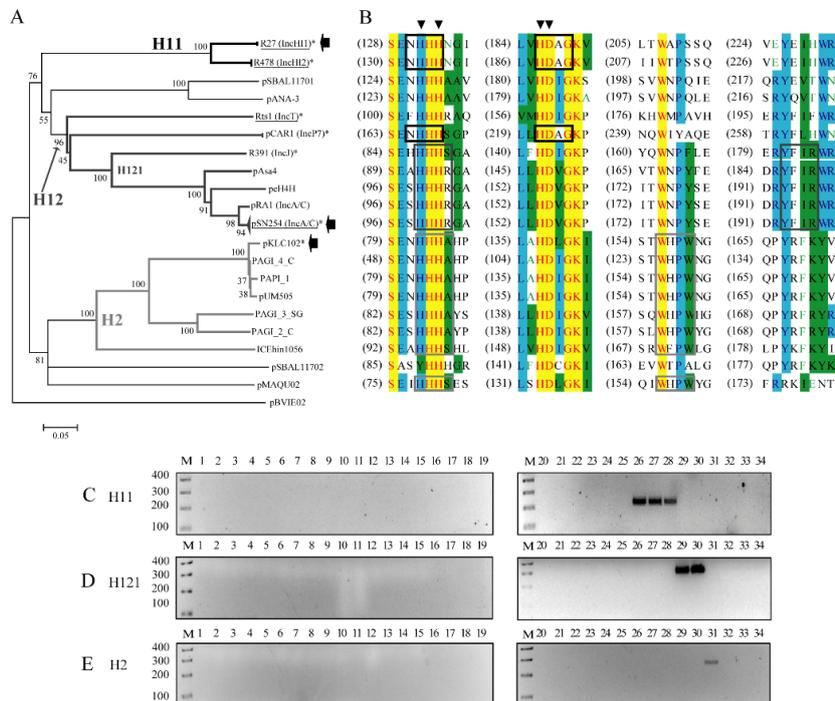


Figura 3.1.F. Validación del método DPMT para la familia MOB_H. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_H. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*H11-f+H11-r*, negro continuo; *H121-f+H121-r*, gris oscuro continuo; *H2-f+H2-r*, gris continuo). C) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{H11} (*H11-f+H11-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{H121} (*H121-f+H121-r*). E) Amplicones obtenidos con los oligos correspondientes a la subfamilia MOB_{H2} (*H2-f+H2-r*). Símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

En la figura 3.1.E. se observan las zonas utilizadas para el diseño de los cebadores DPMT MOB_Q. Diseñamos tres parejas de sondas parcialmente degeneradas, una por cada subgrupo dentro de MOB_Q. Las sondas directas *Q11-f*, *Q12-f* y *Qu-f* se diseñaron sobre el motivo I (catalítico) de los tres subgrupos MOB definidos, pero los reversos se hicieron en zonas muy distintas. *Q11-r* y *Q12-r* se diseñaron para hibridar sobre el motivo conservado III, mientras que *Qu-r* hibrida sobre el motivo WNAV, una de las zonas más conservadas cercanas al motivo II de estas relaxasas. La pareja de sondas *Q11-f+Q11-r* no amplifica el grupo de relaxasas formado por pTcM, pLAtc2 y pLAtc3, por su gran divergencia. Las tres parejas de cebadores dieron amplificaciones específicas sin reacciones cruzadas. La amplificación se optimizó a 30 repeticiones (figura 3.1.E.).

Familia MOB_H

MOB_H contiene 35 relaxasas (29 de plásmidos y 5 de EICs) en dos grupos (figura 3.1.F.). H1 contiene relaxasas de plásmidos de gran variedad de grupos de replicación, distribuidos de manera coherente a las subdivisiones del grupo. H11 contiene los plásmidos multi-resistentes del complejo de replicación H y H12 integra está formada por relaxasas a los plásmidos IncT, IncP7, IncA/C y EICs, clasificadas como plásmidos IncJ [231].

El grupo IncT consta de un único plásmido completamente secuenciado, Rts1 de *Proteus vulgaris* (figura 3.1.F.) [232]. Se conoce otro miembro del grupo IncT, el plásmido de resistencia R394 [233] del que se sabe que conjuga [234] y cuya relaxasa es idéntica a la del primero (nuestros propios datos, no publicados). También existen datos acerca de la presencia de otros plásmidos IncT en aislados clínicos, implicados en la dispersión de carbapenemasas [149, 235] y ESBLs [236]. Los plásmidos IncP7 son tres, pDK1 [237], un plásmido de *P. putida* HS1 que porta un *cluster* de degradación del tolueno y dos plásmidos degradadores de carbazol y antranilato, pCAR1 y pCAR1.2 [238, 239]. Los tres plásmidos son mayores de 150 kb y tienen sistemas conjugativos completos, por lo que se les presupone capacidad para conjugar. Más aún, existen evidencias de la capacidad conjugativa tanto de pCAR1, como de pCAR1.2 [240]. Los plásmidos IncA/C forman el subgrupo más numeroso dentro de H12. Éstos son plásmidos conjugativos (excepto peH4H, quien porta un T4SS interrumpido por un *cassette* de resistencia a kanamicina) [241], son mayores de 140 kb y se clasifican como multiresistentes. Sus huéspedes naturales son bacterias patógenas humanas o animales (como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*), prevaleciendo sobre otros tipos de plásmidos en aislados multiresistentes de *S. enterica*, obtenidos de animales [242]. Por último, los elementos EICs son moléculas de ADN con dos formas alternas en la bacteria huésped. Por una parte, presentan la capacidad de integrarse en el cromosoma de la célula huésped durante la replicación vegetativa de aquél, como si fueran un bacteriofago atemperado. Por la otra, los EICs son capaces de transferirse a nuevos huéspedes, escindiéndose del cromosoma con el que se han replicado, recircularizándose y conjugando. Por tanto, el interés de estos elementos radica en su capacidad para transmitir resistencias a diversos antibióticos, por supuesto, pero también en la posibilidad de transmitir, a la manera de los fagos, genes del cromosoma del huésped a un nuevo recipiente [231, 243]. En el pasado, EICs como R391 fueron clasificados como plásmidos de resistencia del grupo de incompatibilidad IncJ [244]. Hoy día se sabe que estos elementos pertenecen a la familia de EICs o transposones conjugativos [28, 31], elementos con un T4SS completo que les permite conjugar de manera autónoma. Los plásmidos IncA/C y los elementos semejantes a R391, forman el subgrupo H121 dentro de H12 (figura 3.1.F.).

Las relaxasas del subgrupo H2 (figura 3.1.F.) también se encuentran codificadas mayoritariamente en EICs, excepto la del plásmido pUM505 [245]. Todas son de *P. aeruginosa* o *Cupriavidus metallidurans*, cargando con genes de virulencia, de resistencia a antibióticos y a metales pesados [246]. En cuanto a los plásmidos, sus tamaños están entre los 90 kb y los 200 kb. pKLC102 se puede encontrar de manera estable tanto integrado como libre en el citoplasma de *P. aeruginosa* C [247], mientras que pUM505 no se integra [245].

Fuera de H2 encontramos dos plásmidos nativos de bacterias marinas, pSBAL11702 [248] y pMAQU02 (CP000516) (*Sh. baltica* OS117 y *Marinobacter aquaeoli* VT8, respectivamente). Ninguno ellos se integra en el cromosoma de su huésped. pSBAL11702 parece críptico, mientras que pMAQU02 carga con genes de resistencia a mercurio y cotransportadores de metales pesados y protones.

Sección 3

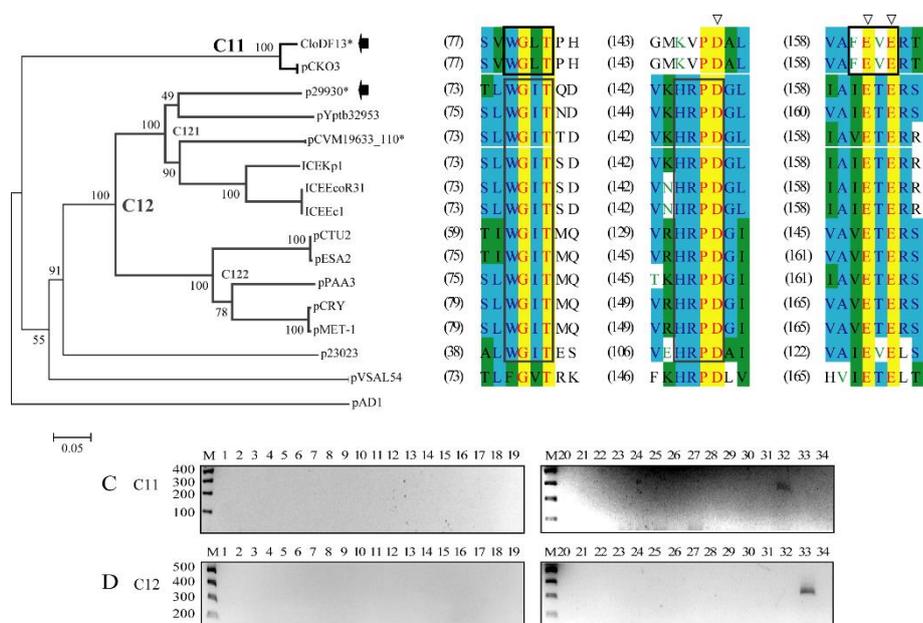


Figura 3.1.G. Validación del método DPMT para la familia MOB_C. A) Árbol filogenético de las relaxasas MOB_C. B) Alineamiento de los motivos de las relaxasas empleados en el diseño de las parejas de oligonucleótidos semi-degenerados (*C11-f+C11-r*, negro continuo; *C12-f+C12-r*, gris oscuro continuo). C) Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos correspondientes a la subfamilia MOB_{C11} (*C11-f+C11-r*). D) Amplicones obtenidos con los oligonucleótidos correspondientes a la subfamilia MOB_{C12} (*C12-f+C12-r*). Las cabezas de flecha blancas señalan residuos conservados dentro del probable motivo III de MOB_C [2]. El resto de símbolos, colores y calles, igual que en la figura 3.1.A.

Disponemos de tres parejas de oligonucleótidos parcialmente degeneradas para amplificar esta familia de relaxasas (ver figura 3.1.F.). La gran diversidad de los dominios N-terminales de las relaxasas MOB_H obligó a situar los cebadores directos sobre las tres histidinas del motivo III alternativo definido para esta familia [2]. Los residuos anterior o posterior a las tres histidinas permiten la diferenciación de cada subgrupo descrito en MOB_H. En cuanto al diseño de los cebadores reversos, aprovechamos que todas las MOB_H presentan un motivo HD-hidrolasa en su extremo C-terminal [2] *H11-r* se diseñó sobre los residuos histidina y aspártico del motivo conservado HD [249], mientras que *H121-r* y *H2-r* fueron diseñados en zonas conservadas propias de cada uno de estos *cluster* de relaxasas, dentro del motivo conservado HD-hidrolasa.

La pareja de sondas *H11-f+H11-r* produjo un amplicón de un tamaño ligeramente superior al esperado de manera recurrente. Se procedió a su secuenciación y se vio que se había amplificado el gen *ykgB* del cromosoma de *E. coli* K12 (NC_000913) que resulta ser un gen de función desconocida. Eliminamos la amplificación de este gen con un protocolo de PCR *touchdown* (tabla 2.4.A.). La secuencia del amplicón obtenido de esta manera resultó idéntica a la de las relaxasas de control para este grupo y de un tamaño adecuado al esperado (ver figura 3.1.F.). La validación de las parejas de sondas de las subfamilias H121 y H2 no produjo reacciones cruzadas.

Familia MOB_C

La familia MOB_C se compone de 22 relaxasas 19 de ellas de plásmidos y 3 de EICs (figura 3.1.G.). Los plásmidos del subgrupo C11, en el que se encuentra el modelo MOB_C, CloDF13, son todos de pequeño tamaño y únicamente con relaxasa y T4CP, que los hacen movilizables. Sus mecanismos de replicación son de tipo ColE1 y cargan con genes de colicinas [250, 251]. En cualquier caso, siempre se asocian a plásmidos de grupos de replicación más estudiados y cargando con genes de resistencia a antibióticos [250, 252]. Las evidencias empíricas sobre la movilización de CloDF13 por parte de los plásmidos R388, F y RP4 [119, 253] y la presencia de una proteína acopladora en la secuencia de la mayoría de los plásmidos C11 sugiere que éstos sean más versátiles a la hora de ser movilizados que otros plásmidos.

La rama MOB_{C12} contiene relaxasas tanto de plásmidos como de EICs, en ambos casos conjugativos por tener T4SS completos. Podemos hacer dos subdivisiones de MOB_{C12} (figura 3.1.G.). La primera, MOB_{C121}, está formado por las relaxasas de cuatro plásmidos y tres EICs (figura 3.1.G.). De los cuatro, pCVM19633_110 [254] y pCK41 (NC_014725; no publicado) son multirresistentes. El primero es propio de un patógeno humano (*S. enterica*) y el segundo de peces (*Edwardsiella tarda*), respectivamente. Los restantes, p29930 [255] y pYptb32953 [256], son crípticos. pYptb32953, además, posee un rango de huésped muy reducido [257]. En cuanto a los tres EICs de este grupo, todas determinan la virulencia de sus huéspedes porque portan genes para la síntesis de diferentes sideróforos [258-260].

MOB_{C122} está formado por plásmidos aislados mayoritariamente en patógenos humanos, como pESA2 [261] y pCTU2 [262], nativos de dos especies del género *Cronobacter*, un patógeno emergente en niños que provoca meningitis neonatal, sepsis y enterocolitis necrotizante [262, 263] y pPAA3 [264] de *Photorhabdus asymbiotica*, un patógeno de insectos con capacidad para infectar a seres humanos. Los dos primeros plásmidos parecen no estar involucrados en la patología que causa su huésped, al carecer de determinantes de virulencia en su secuencia, mientras que el tercero podría contribuir al proceso patológico del mismo [264]. Los tres tienen un sistema T4SS completo está presente, por lo que se asume que podrían conjugarse. Los plásmidos pCRY (NC_005814) y pMET-1 (NC_010726) están altamente relacionados, pero el primero es críptico, mientras que el segundo lleva genes de resistencia a múltiples antibióticos insertados en un elemento Tn1331.2 [265]. El plásmido p23023, nativo de *Vibrio mediterranei* y al parecer críptico [266], presenta una relaxasa fuera de los dos grupos anteriores (figura 3.1.G.). Porta un T4SS completo y por tanto se le considera conjugativo.

Finalmente, hay un tercer grupo compuesto por las relaxasas de los plásmidos pVSAL54 (NC_011315), pVAL54 y pVAL43 (NC_006859). Todos son plásmidos de *Aliivibrio salmonicida*, menores de 6 kb, probablemente movilizables (no hay evidencias empíricas) y son crípticos, pues carecen de genes de fenotipo detectable.

Las relaxasas MOB_C carecen de motivos conservados canónicos [80, 113], pero conservan el motivo D-x₆₋₁₇-E-x-E-(RL)-x₂-K-x₃-R-(YF) [2]. Trabajos recientes, realizados en TraX_{pAD1}, han demostrado la importancia de los residuos conservados E28, D152, E170, E172, K176, R180, Y181 y Y203 en los procesos de corte y transferencia del ADN en la conjugación de estos plásmidos. En el mismo trabajo, la mutación Y181A abole por completo la conjugación, lo que sugiere que desarrolla un papel de residuo catalítico en estas relaxasas [267]. Usamos este motivo para diseñar los dos iniciadores reversos de este grupo, sobre los residuos relacionados con la coordinación del átomo metálico. Las sondas directas fueron diseñadas sobre una zona también muy conservada, pero ajena al anterior (figura 3.1.G.). En la validación se observa que no existen reacciones cruzadas entre los controles de MOB_C ni con los de otros grupos MOB (figura 3.1.G.). Los iniciadores *CII* produjeron un amplicón mayor de lo esperado, eliminado por medio de una PCR *touchdown* (tabla 2.4.A.).

3.2. Identificación de la relaxasa por medio del *array* en suspensión.

La presencia de relaxasas de un mismo grupo MOB en plásmidos de distintos grupos incompatibilidad (*e.g.* figuras 3.1.A. y B.), que coexisten en una misma célula huésped, representa un problema para la identificación de las mismas. En estos casos, una misma pareja de cebadores DPMT produce un amplicón que contiene secuencias de todas las relaxasas del mismo grupo MOB contenidas en el mismo aislado. La secuenciación de este producto de amplificación produciría un cromatograma con dos

Sección 3

secuencias superpuestas, con lo que no podríamos identificar ninguna de las relaxasas presentes en el aislado. Una manera de solventar este problema técnico es acudir al *array* en suspensión.

Realizamos la validación de las 36 sondas del *array* en suspensión (tabla 2.5.A.) utilizando como dianas las relaxasas de la genoteca descrita en la sección 2.1., de acuerdo con el proceso que se describe en la sección 2.5. Buscamos la posible existencia de reacciones de hibridación cruzadas que nos impidieran identificar correctamente relaxasas del mismo grupo MOB, co-amplificadas por una misma pareja de cebadores DPMT. Por claridad, las figuras de este apartado han sido incorporadas al material suplementario.

En general, las curvas de validación obtenidas para cada sonda, producen un máximo de fluorescencia cuando las muestras han sido diluidas en proporciones entre 1:5 y 1:10² (ver las figuras suplementarias 3.2.A. a 3.2.I.). Hay notables excepciones, como por ejemplo las sondas P1113 y P1114, para las que observamos un máximo en la dilución 1:1 (figura suplementaria 3.2.C), o las sondas de la familia MOB_{P3/P4}, para las que los máximos valores de la señal se observan en la dilución 1:10³ o 1:10⁴ (figura suplementaria 3.2.F.).

La intensidad de la señal varía dependiendo del juego de sondas. El rango de las medianas de fluorescencia observadas oscila entre las 4000 U.F.A. (sonda P422; figura suplementaria 3.2.F.) a las 185 U.F.A. (sonda P1111; figura suplementaria 3.2.C.). Esta variabilidad indica que sería necesario un ajuste de las condiciones genéricas de hibridación, utilizadas para cada juego de sondas, antes de poner en marcha un nuevo panel experimental. En cualquier caso, la señal máxima de la mayoría de las validaciones es dos veces mayor que cualquiera de los controles negativos del panel experimental correspondiente, excepto para las sondas F122, F124 y P31 (figuras suplementarias 3.2.B. y 3.2.F.).

En el primer caso, también se observa que los valores U.F.A. máximos aparecen con la muestra sin diluir en todas las sondas y cómo la tendencia de estos valores es a reducirse con las diluciones. Se puede considerar, por tanto, que existen reacciones cruzadas entre el amplicón de la relaxasa de pSLT con todas las sondas del panel F12 en base a los medianas de U.F.A. observadas en todas las diluciones.

En el segundo caso, se observa una tendencia similar a la anterior, pero no tan acusada. De hecho, los valores U.F.A. en las diluciones 1:2 a 1:10 cumplen las condiciones para considerarse un verdadero positivo. Sin embargo, los altos valores de fluorescencia observados para las otras sondas indican que se están produciendo hibridaciones inespecíficas entre el panel experimental y el amplicón de la relaxasa de pKPN4. En conclusión, las sondas del panel F12 precisan un replanteamiento pormenorizado para ser utilizadas con absoluta seguridad para identificar plásmidos MBF12/IncFII_S o IncFII_K.

En el tercer caso, la sonda P31 presenta el máximo de fluorescencia en la dilución 1:10⁴, cuando en el resto de los paneles la señal baja por la reducción de la cantidad de diana. En este caso es probable que la cantidad de ADN sea todavía demasiado elevada como para producir una curva patrón con la forma esperada. En los tres casos presentados, la ausencia de aislados con varios amplicones del mismo grupo MOB hizo innecesario mejorar el rendimiento de dichos paneles (ver sección 3.3.).

Otra sonda que puede dar problemas de interpretación de resultados es la H124 (figura suplementaria 3.2.I.). La gráfica que observamos es idéntica a las demás, pero la reducción del valor de U.F.A. derivada de las diluciones seriadas se invierte en el paso de 1:10² a 1:10³. Este efecto se produce para todo el panel experimental, dando lugar a un falso positivo generalizado en la dilución 1:10³. Igual que en el caso de la intensidad de señal variable, las condiciones de la hibridación de la sonda H124 deben ser revisadas adecuadamente

3.3. Diversidad de las relaxasas en distintas colecciones de aislados bacterianos.

El siguiente paso consistió en comprobar la capacidad de las sondas DPMT para clasificar plásmidos de distintas colecciones de aislados bacterianos. Nuestro interés se centró en el análisis de colecciones con plásmidos bien caracterizados previamente por el método PBRT y clasificados según una serie de características adicionales, principalmente los genes accesorios que porta cada uno. Dada la importancia para la epidemiología clínica de la correcta y rápida identificación y clasificación de los plásmidos multiresistentes conjugativos, centramos especialmente nuestra atención en colecciones de aislados hospitalarios, elegidos por sus perfiles de resistencias a antibióticos o por estar presentes en ciertas infecciones de manera recurrente. Los amplicones obtenidos fueron identificados como describimos en la Sección 2, según los requerimientos de los laboratorios de origen

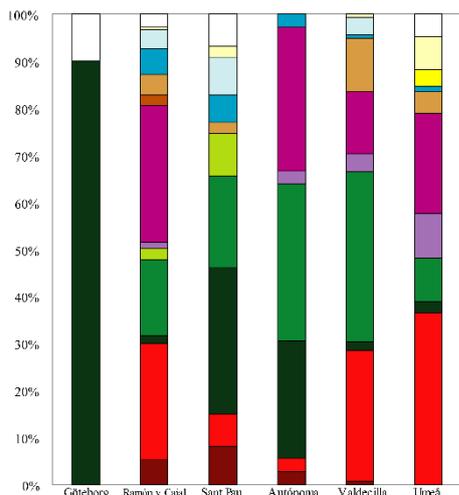


Figura 3.3.A. Abundancia de los distintos tipos de relaxasa. Datos relativos de abundancia de las subfamilias MOB en las distintas colecciones de aislados bacterianos. Cada subfamilia se representa con un color concreto: rojo oscuro, F11; rojo, F12; verde oscuro, P11; verde, P12; verde claro, P131; violeta, P3; morado, P51; marrón, Q12; marrón claro, Qu; azul, H11; azul claro, H121; amarillo, C11; amarillo claro, C12. La parte blanca de cada columna indica el porcentaje de aislados que no pudieron ser identificados por DPMT. Más información en los apartados dedicados a cada colección y en el Material Suplementario.

Colección de origen ambiental

Como se puede ver en la tabla 3.3.A., todos los plásmidos, excepto pBFp1, amplificaron con la pareja de oligos P11. Dado que no había más plásmidos en los aislados que se nos proporcionó, continuamos el análisis por DPMT

únicamente con pBFp1, con resultados negativos. Intentamos demostrar que pBFp1 portaba una relaxasa realizando un experimento de conjugación, con *P. Putida* KT2442, *E. coli* DH5α y *E. coli* J53 como distintos receptores (tabla 2.1.A.), pero no observamos transconjugantes. Intentamos extraer el ADN del plásmido y visualizarlo en un gel, para confirmar la presencia de pBFp1 en la cepa que se nos había enviado. Al hacerlo (no mostrado) decidimos proceder a la secuenciación completa del plásmido (ver Sección 3.4.).

Los productos de la amplificación con la pareja de sondas DPMT P11, fueron secuenciados, se tradujo la secuencia de ADN resultante (unos 58 aminoácidos de longitud aproximada cada una) y se buscó su homólogo más próximo. Con estas secuencias reconstruimos la filogenia de MOB_{P11} con las relaxasas de la colección de esta colección (figura 3.3.B.). Seis de las relaxasas secuenciadas son idénticas a relaxasas de plásmidos IncP1β-1: pMCB2, pMCB5, pMCB9, pMCBF1 y pMCBFp5 a la del plásmido modelo, R751 y pMCY7 a la del plásmido pA1 [268].

Tabla 3.3.A. Caracterización de plásmidos de la Universidad de Göteborg por DPMT.

a. Nombre del plásmido proporcionado por la Universidad de Göteborg.

Plásmido ^a	Resistencia ^b	F11 ^c	F12	P11	P12	P131	P14	P3	P4	P51	P52	P53	Q11	Q12	Qu	H11	H121	H2	C11	C12
pBFp1	Hg; Km	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pMCBFp2	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCBF1	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCB2	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCB3	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCB5	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCBFp5	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCBF6	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCY7	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pMCB9	Hg	NO	NO	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

b. Resistencia por la que fueron seleccionados los plásmidos de la colección. Km, kanamicina 50µgr/mL. Hg, mercurio 25µgr/mL.

c. Resultado de la amplificación de cada plásmido con la pareja de oligos DPMT indicada. Un guión (-) indica ausencia de amplificación; una cruz (+) indica amplificación positiva; NO indica que no se realizó la prueba

Sección 3

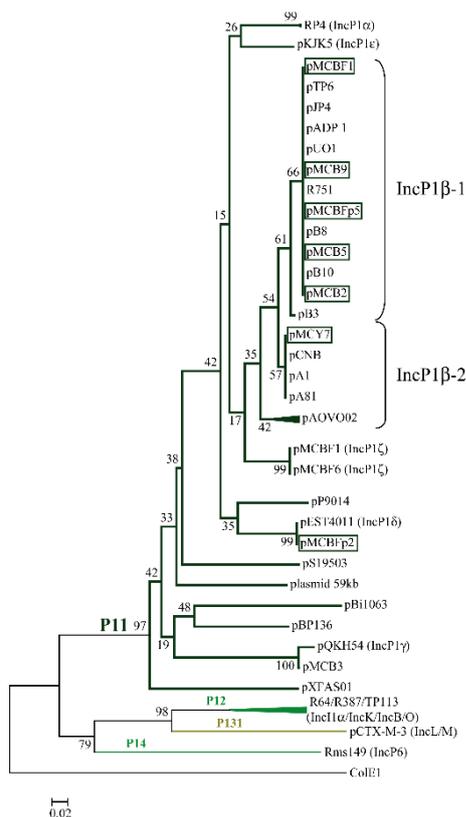


Figura 3.3.B. Filogenia de las relaxasas de la Universidad de Göteborg dentro de MOB_{P1}.

Esta filogenia se ha reconstruido tal como se indica en la Sección 2, pero utilizando únicamente el alineamiento de los 58 aminoácidos amplificados por los oligos *P11-f+PI-r*. Por tanto, la robustez estadística de su topología no es tanta como sería deseable por los problemas que plantea la reconstrucción de historias evolutivas a partir de secuencias de datos tan cortas. Las secuencias obtenidas aparecen recuadradas. Acompañando la filogenia de MOB_{P11} aparecen relaxasas representativas del resto de MOB_{P1} y de los grupos Inc de plásmidos que contiene esta subfamilia. Se han incluido un ejemplo de cada en aras de la claridad de esta figura. Para mayor información sobre esta subfamilia, consultar la figura 3.1.B. y su correspondiente texto.

a NikB_R387 (IncK) y 11 iguales a NikB_pSERB1 (IncB/O-like). De los once aislados con relaxasas NikB_pSERB1, cuatro (TC2#11, #14, #38 y #40) tenían también relaxasas idénticas a las NikB de R64 y R387 (TC2#14), pSC138 y pO113 (TC2#38) o R64 y pO113 (el resto).

Los resultados de PBRT de los aislados TC2#11 y #14 no concuerdan con los descritos, ya que únicamente tienen un replicón de tipo FII. Por otra parte, TC2#38 y #40 tienen replicones de tipo I1 y K, lo cual concordaría con los resultados de su contenido en relaxasas. Por último, encontramos dos moléculas que no fuimos capaces de identificar (TC1#30 y TC2#17) ni por secuenciación ni por el array en suspensión. Las relaxasas P131 se identificaron por secuenciación, resultando idénticas a la relaxasa de pCTX-M3.

El plásmido IncP1ζ pMCF6 fue secuenciado completamente con posterioridad a nuestro análisis [133]. La secuencia de su relaxasa y la del amplicón obtenido en este trabajo son 100% idénticas. Por último, tenemos dos relaxasas relacionadas con los subgrupos δ y γ de IncP1. La relaxasa de pMCFp2 es idéntica 100% a la relaxasa plásmido IncP1δ, pEST4011, mientras que la del plásmido pMCF3 lo es a la del plásmido IncP1γ, pQKH54.

Colección del Hospital Ramón y Cajal.

Las cinco familias de relaxasas estudiadas están presentes entre las 246 detectadas, pero su distribución no es homogénea. La familia más representada es MOB_P (133/246), seguida de MOB_F (73/246), MOB_H (23/246), MOB_Q (16/246) y MOB_C (1/246). Siete aislados con plásmidos conjugativos no pudieron ser amplificados con ninguna pareja de sondas de las empleadas. Estas siete cepas fueron seleccionadas para análisis posteriores (figura 3.3.C.).

De entre las subfamilias de MOB_P, la más abundante es MOB_{P5} (74/133) seguida por MOB_{P1} (49/133), MOB_{P4} (7/133) y MOB_{P3} (3/133). Las MOB_{P5} detectadas son todas del grupo P51. Identificamos, por medio del array en suspensión seis de ellas, viendo que TC1#11, #21 y #57 correspondían a relaxasas de tipo ColE1, TC1#55 y #58 a relaxasas de tipo pCKO2 y TC1#56 no hibridaba con ninguna sonda.

Dentro de las relaxasas MOB_{P1}, las más abundantes son las P12 (39/49), las P131 (6/49) y las P11 (4/49). Identificamos las relaxasas P12 tanto por secuenciación, como por array en suspensión: encontramos 9 relaxasas idénticas a NikB_R64 (IncI1α), 16 idénticas a NikB_pSC138; 1 idéntica

Sección 3

Colección H. Ramón y Cajal

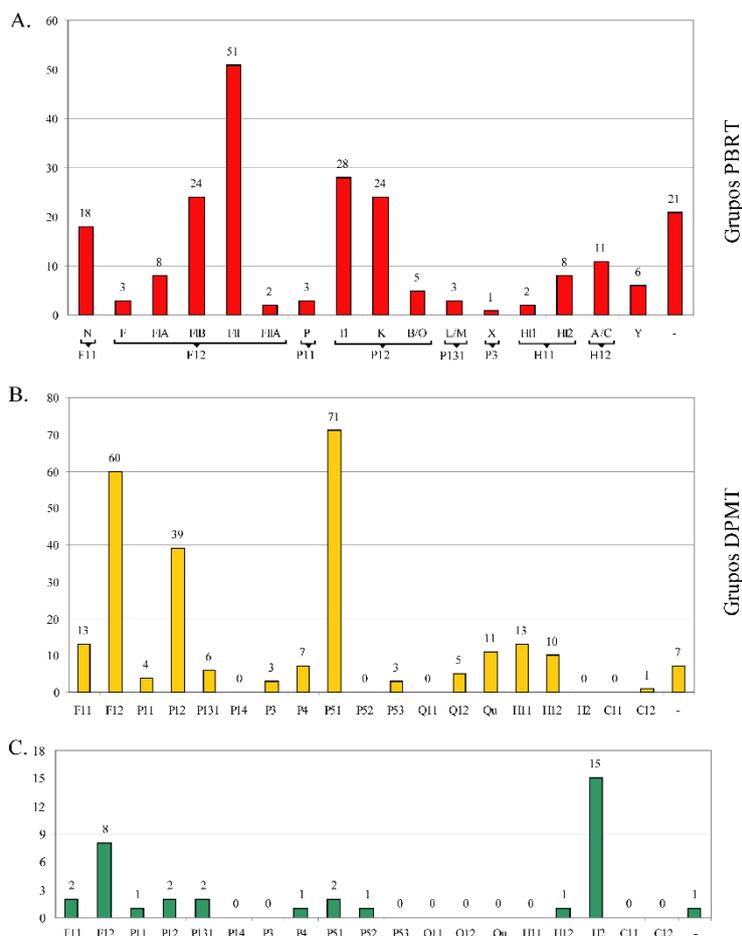


Figura 3.3.C. Caracterización de las cepas del Hospital Ramón y Cajal por PBRT y DPMT. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos en la misma colección de aislados. Cada categoría del eje de abscisas representa una pareja de cebadores de cada uno de los dos métodos. La gráfica A. detalla los resultados obtenidos con el método PBRT; bajo las categorías de cebadores PBRT se indica qué cebadores DPMT amplifica esta clase de relaxasas. La gráfica B. detalla los resultados obtenidos con el método DPMT. La gráfica C. indica los resultados del método DPMT sobre los aislados PBRT negativos. En todos los casos, el número de amplicones obtenidos se indica sobre cada barra. La última barra de cada gráfica indica el número de aislados no clasificados en cada uno de los dos métodos. Obsérvese que DPMT deja sin clasificar la tercera parte de aislados de los que deja PBRT. Para más detalles sobre cada aislado, véase la tabla suplementaria 2.

Las relaxasas tipo P3 fueron identificadas por medio del array en suspensión, siendo clasificadas todas como tipo pOLA52 (IncX1). Los 7 amplicones P4 encontrados (TC1#17, #18, #36, #37, #55, #61 y #62) fueron tratados de la misma forma, pero no hibridaron con la sonda P422 (tabla 2.5.A.). La secuenciación del amplicón las identificó como L-1,2-propanediol oxidorreductasas, producto del gen *fucO* (AET55257.1) del cromosoma de *Salmonella enterica*. Usar el protocolo de la PCR *touchdown* [120] fue completamente inútil, dado que eliminamos de igual manera la detección del control positivo, lo cual es indeseable. La conjugación de estos aislados hacia un huésped de la especie *E. coli* nos pareció la opción más adecuada, pues todos los aislados implicados en este caso son de la especie *Salmonella*. Se obtuvieron transconjugantes de los mencionados aislados, que conservaban las resistencias a antibióticos descritas en origen, así como el perfil de relaxasas expuesto en la tabla suplementaria 2, pero los amplicones P4 desaparecieron. Por tanto, se trata del único caso de amplificación del cromosoma de la bacteria huésped encontrado, no solo en esta, sino en todas las colecciones analizadas.

Encontramos 73 relaxasas MOB_F, repartidas entre F11 (13/73) y F12 (60/73). Todos los aislados F11⁺, excepto TC1#79, son transconjugantes, de manera que son muy interesantes para nosotros. Algunos de estos aislados F11⁺ son estudiados en profundidad y los resultados obtenidos se exponen en la sección

Sección 3

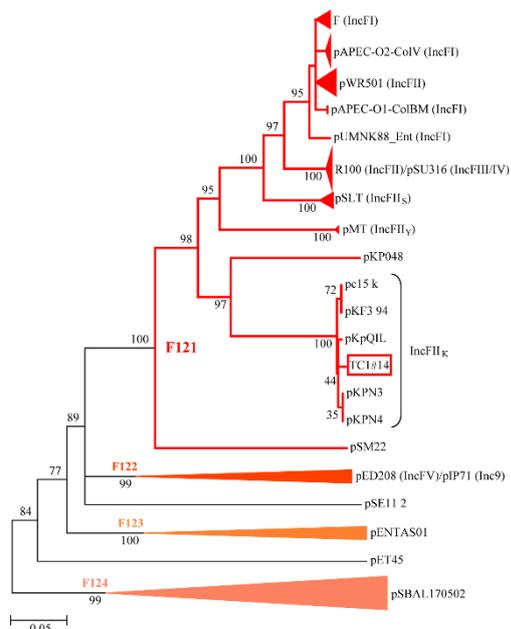


Figura 3.3.D. Filogenia de la subfamilia MOB_{F12}, actualizada con la relaxasa de TC1#14. Esta filogenia se ha reconstruido como ya se ha explicado (sección 2). Se ha evitado la rama de la subfamilia MOB_{F11} para aportar claridad a la figura. Del mismo modo, los otros *cluster* dentro de MOB_{F12} aparecen comprimidos, aunque se aportan ejemplos de plásmidos representativos para todos los casos. La nueva relaxasa aparece recuadrada en rojo. Para más información sobre esta familia MOB, acudir a la figura 3.1.A. y a su correspondiente texto asociado.

3.4. Las secuencias obtenidas de los amplicones indican que 8/13 relaxasas (TC1#57, #58, #59, #60, TC2#19, #29, #32 y #33) son 100% idénticas a la del plásmido R46 (IncN1). Estos ocho aislados portan plásmidos conjugativos con tamaños entre 40 y 90 kb y sus replicones son IncN1 según el PBRT. Otros dos aislados (TC1#30, #69) portan relaxasas relacionadas con la del plásmido pCT14 (61% de identidad en sus secuencias de aminoácidos) y un tercero (TC1#79) está relacionada con la del plásmido prototipo IncN1, R46 (78.6% de identidad en sus secuencias de aminoácidos). En ninguno de estos tres aislados se detectó un replicón de tipo IncN previamente por PBRT. Estos tres aislados fueron designados para la secuenciación completa de sus plásmidos F11⁺ (sección 3.5.). Los dos amplicones restantes fueron amplificados y secuenciados en repetidas ocasiones, pero no pudieron ser identificados en modo alguno.

Las relaxasas MOB_{F12} hacen un total de 60 amplicones, 49 de ellos se encuentran relacionadas con alguno de los distintos replicones del complejo F (FIA, FIB y FII), 3 con replicones del complejo I1 (I1 y B/O) y las restantes 8 corresponden a aislados sin replicones detectables (ver tabla suplementaria 2). 28 amplicones fueron identificados por secuenciación (14/60) o por el array en suspensión (14/60) (tabla 2.5.A.). El array en suspensión indica que 11 de las 14 muestras analizadas hibridan con la sonda F121, que identifica relaxasas de los plásmidos IncFI e IncFII; 2 de las 14 muestras hibridan con la sonda F124, que reconoce aquellas relaxasas de plásmidos de multirresistencia de *Klebsiella* (como pKPN3, pKPN4, pKP048 y otros); el último amplicón hibrida con la sonda F122, que identifica relaxasas de plásmidos de virulencia de *Salmonella*, tipo pSLT. La señal observada en este caso es inequívocamente un verdadero positivo, a pesar de los problemas encontrados en la validación de esta sonda concreta del panel experimental F12 del array en suspensión (no mostrado).

La secuenciación de las otras 14 amplificaciones dio como resultado 6/14 relaxasas idénticas a la del plásmido IncFII R100, 4/14 idénticas a la de pAPEC-O2-R, 1/14 relaxasa igual a la de pVM01 y 1/14 semejante un 87% (secuencia de nucleótidos) a la del plásmido pKPN3. Dado que carecíamos de un control adecuado, tanto para el esquema DPMT, como para el BioPlex200, de relaxasas de este último tipo, clonamos la relaxasa tipo pKPN3 del aislado TC1#14 como se ha explicado previamente (sección 2.2.). Dado que desconocíamos la secuencia sobre la que hibridarían los cebadores, se optó por usar las secuencias de su homólogo más próximo, el plásmido pKPN3. Se comprobó que la secuencia de aminoácidos del fragmento clonado del gen, tiene una identidad del 99% con las de los plásmidos IncFII_K del cluster MOB_{F121} (figura 3.3.D.) [114].

Encontramos 23 relaxasas MOB_H: 13/23 relaxasas de tipo H11 y 10/23 de tipo H12, tanto en cepas transconjugantes como en aislados originales. De las 13 relaxasas de tipo H11, 8 están en aislados con

Sección 3

replicones IncHI2, una aparece en un aislado con un replicón IncHI1 y cuatro carecen de replicones relacionados con estos dos grupos. La secuencia de estas relaxasas resultó idéntica a la del plásmido R478 en 12 casos (IncHI2), incluyendo aquellos sin replicón de tipo H. La secuencia de la relaxasa H11 del último aislado (TC1#48) resultó idéntica a la relaxasa del modelo IncHI1, R27, lo que concuerda con su replicón (tabla suplementaria 2). De los 10 aislados H12⁺, siete de ellos portan un replicón A/C, dos, replicones de los complejos F e I y solo uno no pudo ser clasificado por PBRT. Sus secuencias son todas idénticas a la relaxasa del plásmido pSN254, que es modelo del grupo IncA/C de replicación.

Hay 16 amplicones de tipo MOB_Q, relaxasas de plásmidos movilizables fuera de la clasificación PBRT. Hay 5 tipo MOB_{Q12} y los 11 restantes son de tipo MOB_{Qu} (figura 3.1.G.). Secuenciamos los de los aislados TC1#5, #6, #11, #13, #35, #37 y #53; las cuatro primeras son idénticas a la del plásmido pIGWZ12, mientras que las otras tres lo son a la relaxasa del plásmido pMG828-2.

Finalmente, encontramos una relaxasa del subgrupo MOB_{C12}, que igualmente queda fuera del esquema PBRT. Ésta fue encontrada en un aislado sin grupo de replicación detectable e incapaz de conjugar, según el laboratorio de origen. Secuenciado el amplicón, vimos que se trataba de la relaxasa del plásmido MOB_{C12} pCVM19633_110. Clonamos esta relaxasa, como hemos explicado en la sección 2.2., dado que carecíamos de controles para esa rama de la filogenia y su secuencia resultó 100% idéntica a la del mencionado plásmido.

Colección del Hospital Sant Pau i la Santa Creu.

En nuestro laboratorio se llevó a cabo la clasificación de los plásmidos de estos aislados con 14 parejas de sondas DPMT, empezando por las relacionadas con los replicones caracterizados (las parejas P51, P52, P53, Q12 y C11 no estaban disponibles cuando se acometió la clasificación por DPMT). Encontramos un total de 87 amplicones en los 53 aislados, distribuidos entre las distintas clases como se ve en la figura 3.3.E. La clase más abundante en esta colección es, como en los casos anteriores, MOB_P (58/87), seguida de MOB_F (13/87), MOB_H (12/87) y MOB_Q y MOB_C (2/87 cada clase). Dentro de la clase MOB_P encontramos los siguientes datos de abundancias: MOB_{P11} es la subclase más abundante, con 27/58 amplicones. Ninguno de estos 27 aislados P11⁺ contiene un replicón IncP asociado (ver tabla suplementaria 3), pero las relaxasas de tres de ellos (SP#25, #46 y #117), son 100% idénticas a la del plásmido modelo del grupo IncP1 α , RP4.

A las relaxasas P11 le siguen en abundancia las MOB_{P12} (17/58) y las MOB_{P131} (8/58). Las 17 relaxasas P12 se relacionan con replicones del complejo I. Los aislados SP#49 y #88 cargan únicamente un replicón IncB/O y se secuenció su amplicón P12. SP#49 resultó ser un 88.2% idéntica (en secuencia de aminoácidos) a la relaxasa TraI del plásmido pO113 (NC_007365), mientras que SP#88 resultó 100% idéntica a la del plásmido pSC138 (figura 3.3.F.). El resto de relaxasas P12 fueron identificadas por array en suspensión. Nueve de las 15 relaxasas son del tipo R64. De los 6 aislados restantes, 5 llevan dos relaxasas P12 (SP#24 R64+pO113; SP#59 pSC138+ R387; SP#81, #85 y #86, R387+pO113; todos estos datos son acordes con el contenido en replicones de estos aislados) y una, SP#87, aun a pesar de llevar una relaxasa que amplifica de manera evidente, su amplicón no hibrida con las sondas del array en suspensión. También, todas las muestras P131⁺ (8/58) se corresponden con aislados con replicones IncL/M y relaxasas idénticas a la del plásmido pCTX-M3.

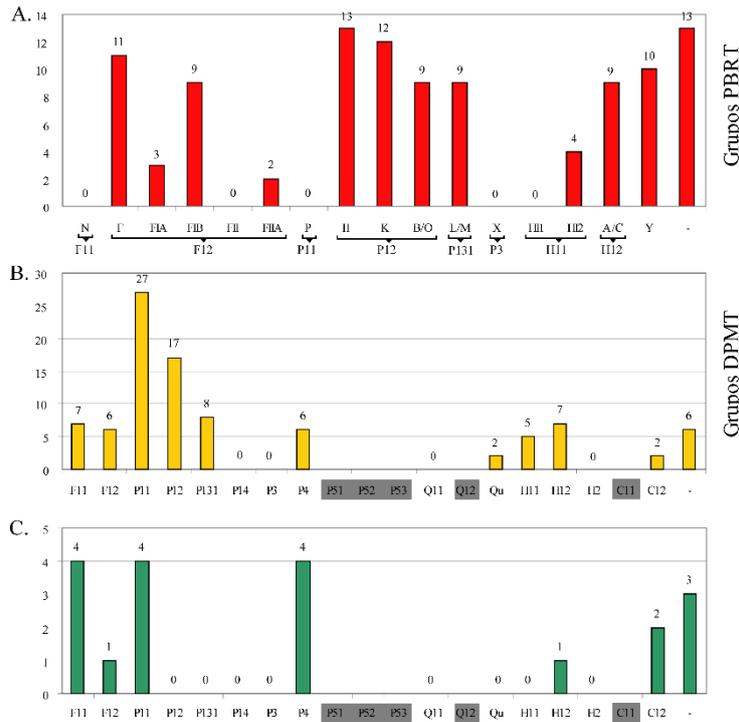


Figura 3.3.E. Caracterización de las cepas del Hospital Sant Pau i la Santa Creu por PBRT y DPMT. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos en la misma colección de aislados. Cada categoría del eje de abscisas representa una pareja de cebadores de cada uno de los dos métodos. La gráfica A, detalla los resultados obtenidos con el método PBRT; bajo las categorías de cebadores PBRT se indica qué cebadores DPMT amplifica esta clase de relaxasas. La gráfica B, detalla los resultados obtenidos con el método DPMT. La gráfica C, indica los resultados del método DPMT sobre los aislados PBRT negativos. En todos los casos, el número de amplicones obtenidos se indica sobre cada barra. La última barra de cada gráfica indica el número de aislados inclasificables en cada uno de los dos métodos. Obsérvese que DPMT deja sin clasificar la mitad de aislados de los que deja PBRT. Las categorías sombreadas en gris en el eje de abscisas indican los cebadores DPMT no disponibles para esta colección. Para más detalles sobre cada aislado, véase la tabla suplementaria 3.

Las siguientes relaxasas más frecuentes son las de la familia MOB_F (13/81), distribuidas entre F11 (7/13) y F12 (6/13). De entre los aislados $F11^+$, no hay ninguno con replicón *IncN* o *IncW*, asociados con MOB_{F11} . Es más, cuatro aislados (SP#25, #42, #3.08 y #7.08) carecen de replicón amplificable por PBRT. El péptido obtenido de la secuencia $F11^+$ (excepto de los aislados SP#3.08 y #7.08) son 100% idénticas a

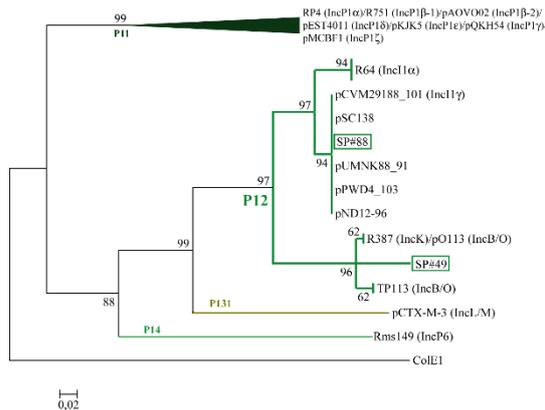


Figura 3.3.F. Filogenia de la subfamilia MOB_{P12} añadiendo las relaxasas de aislados *IncB/O*. Esta filogenia se ha reconstruido como ya se ha indicado (Sección 2) salvo que aquí hemos utilizado únicamente el fragmento amplificado por las correspondientes sondas DPMT (de unos 51 aminoácidos de longitud) de manera que la topología de la misma puede variar respecto a la presentada en la figura 3.1.B. Los otros *cluster* dentro de MOB_{P1} aparecen comprimidos por claridad, aportándose ejemplos representativos contenidos en ellos. Las nuevas relaxasas aparecen recuadradas en verde. Más información sobre MOB_{P1} en la figura 3.1.B.

la relaxasa del plásmido p271A, modelo del grupo *IncN2* de replicación [153] y un 91% idénticas a la del plásmido *IncN1* R46.R46 en un 91%. Los dos aislados $F11^+$ restantes secuenciados, SP#77 y #89, llevan relaxasas idénticas al 100% (en secuencia de aminoácidos) a la relaxasa del plásmido *IncN* pN3.

Entre las relaxasas MOB_F hay seis del tipo F12, cuatro de ellas asociadas con replicones del complejo F, (ver tabla suplementaria 3). Obtuvimos las identidades de estas relaxasas por medio del array en suspensión. Todos los amplicones, excepto el de SP#6E, hibridaron con la sonda F121 (tabla 2.5.A.), que identifica relaxasas como la de los plásmidos F o R100. Esto concuerda con lo esperado analizando los replicones de estos aislados. El amplicón de SP#6E hibridó con la sonda F123, que detecta las

Sección 3

relaxasas semejantes a la del plásmido MT, nativo de *Yersinia*. Estos plásmidos no eran detectables por medio del sistema PBRT, pero actualmente sí [11].

Encontramos 12 relaxasas del grupo MOB_H, distribuidas entre los subgrupos H11 (5/12) y H12 (7/12). Todos los aislados H11⁺ tienen un replicón HI2 (excepto SP#7.08), mientras que los aislados H12⁺ tienen todos uno A/C. Dadas estas coincidencias, renunciamos a secuenciar estos amplicones, ya que podríamos esperar una identidad absoluta con las relaxasas de R478 (aislados H11/IncHI2) y de pSN254 (aislados H12/IncA/C), como hemos visto en casos de las colecciones anteriores. Para terminar con esta colección, detectamos dos replicones del tipo MOB_{C11} y otros dos de tipo MOB_{Qu}. Dada su escasa representatividad en esta colección, descartamos su identificación por secuenciación.

Colección de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los 16 aislados analizados fueron amplificados con las 19 parejas de sondas DPMT disponibles. Se obtuvieron 35 amplicones, (tabla 3.3.B.; más detalles en la tabla suplementaria 4). La familia MOB más abundante es la suma de todas las subfamilias de MOB_P (32/35), seguida de MOB_F (2/35) y MOB_H (1/35). Dentro de las subfamilias MOB_P, la más abundante es la P12 (11/32), seguida de P51 (11/32), P1 (9/32) y P3 (1/32). Identificamos las relaxasas P12 por medio del array en suspensión, con los siguientes resultados: 6/11 amplicones hibridaron con la sonda P123, correspondiente a una relaxasa de tipo pO113, un plásmido IncB/O (figura 3.1.B.). Dado que los cebadores para los grupos K y B/O propuesto por [8] no hibridan adecuadamente con sus dianas, este resultado no es sorprendente, antes bien esperable. Otros dos amplicones (2/11) hibridan con la sonda P1212 del array en suspensión. Esto equivale a decir que se trata de relaxasas semejantes a las del plásmido pSC138 (tabla 2.5.A.). Por último, en 3/11 casos no obtuvimos una hibridación con ninguna sonda y se dejó de intentar su identificación.

Decidimos no identificar los amplicones P51, pero sí los P11, ya que los primeros no se relacionan con los genes de resistencia detectados entre los aislados de esta colección [217]. Las secuencias de los nueve amplicones P11 son 100% idénticas a la secuencia de aminoácidos de la relaxasa del plásmido IncP1 α RP4. Sin embargo, ninguno de ellos hibridó con la sonda correspondiente a IncP del esquema de Couturier.

A continuación, tenemos dos relaxasas de la familia MOB_F, una F11 y otra F12. Secuenciamos el amplicón de la relaxasa F11, obteniendo una secuencia de aminoácidos un 45.6% idéntica a la del plásmido IncN1 R46 (su homólogo más próximo es la secuencia de la relaxasa del plásmido MOB_{F11} pCT14, que no se clasifica en ninguno de los grupos de incompatibilidad definidos en la literatura). Por esta diferencia, consideramos que la relaxasa F11⁺ del aislado UAB#5 merecía ser analizada en más detalle (sección 3.5.).

Tabla 3.3.B. Caracterización de plásmidos de la Universidad Autónoma de Barcelona por DPMT.

Aislado ^a	F11 ^b	F12	P11	P12	P131	P14	P3	P4	P51	P52	P53	Q11	Q12	Qu	H11	H121	H2	C11	C12
UAB#1	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#2	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
UAB#5	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#9	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#10 [¶]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#11	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#12	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#13	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#14	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#15	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#16	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a. Nombre de las cepas proporcionadas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

b. Resultado de la amplificación de cada plásmido con la pareja de oligonucleótidos DPMT indicada. Un guión (-) indica ausencia de amplificación; una cruz (+) indica amplificación positiva.

¶. Aislados sin relaxasa detectable por DPMT

Sección 3

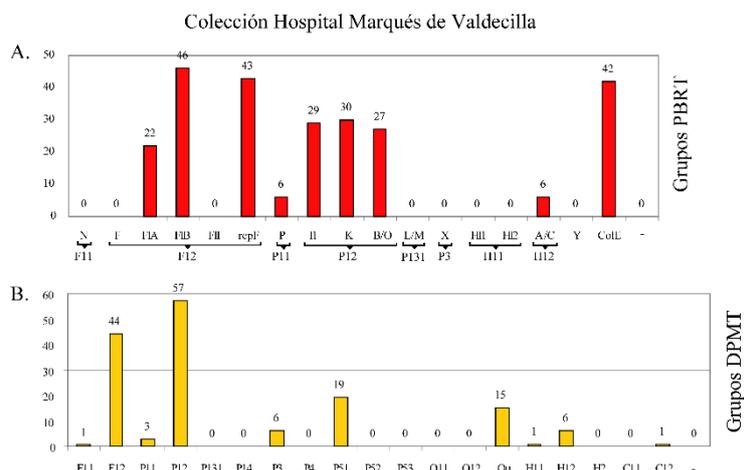


Figura 3.3.G. Resultados de la clasificación de la colección del HUMdV con el método DPMT. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos en la misma colección de aislados. Cada categoría del eje de abscisas representa una pareja de cebadores de cada uno de los dos métodos. La gráfica A. detalla los resultados obtenidos con el método PBRT; bajo las categorías de cebadores PBRT se indica qué cebadores DPMT amplifica las relaxasas de estos plásmidos. La gráfica B. detalla los resultados obtenidos con el método DPMT. En todos los casos, el número de amplicones obtenidos se indica sobre cada barra. En esta colección no existen casos inclasificables por ninguno de los dos métodos. Para más detalles sobre cada aislado, véase la tabla suplementaria 5.

Para terminar con esta colección y sus relaxasas, identificamos la relaxasa amplificada con las sondas *H11-f+H11-r*. El amplicón hibridó con la sonda H112 del array en suspensión, lo cual equivale a decir que la relaxasa de este aislado es igual a la de los plásmidos IncHI2, cuyo modelo es el plásmido multirresistente R478.

Colección del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Las dos partes de esta colección de aislados fueron clasificadas con las 19 parejas de sondas DPMT. En total, de los 76 aislados analizados, obtuvimos 153 amplicones repartidos entre las cinco familias MOB consideradas (figura 3.3.G.). Primero, no encontramos ningún aislado sin relaxasa amplificable. Segundo, la abundancia de las distintas familias mantiene la tónica expuesta en los anteriores apartados, es decir, la familia MOB_P fue la más frecuentemente encontrada (85/153), seguida de la MOB_F (45/153), MOB_Q (18/153), MOB_H (7/153) y MOB_C (1/153) (figura 3.2.G.). Dentro de MOB_P la clase más abundante es P12 (57/85), seguido de la P51 (19/85), P31 (6/85) y P11 (3/85). Las relaxasas P12 fueron identificadas bien por secuenciación, bien por array en suspensión. Los datos obtenidos del array en suspensión indican que las relaxasas más comunes son aquellas semejantes a la del plásmido pO113 (29/57); estas relaxasas siempre están relacionadas, en esta colección, con plásmidos IncK (del complejo de replicación I), conjugativos y que además aparecen de manera prácticamente exclusiva en la colección V1 (28 del total de relaxasas pO113-like). Cinco de los 57 aislados P12⁺ poseen dos relaxasas tipo P12 (V1#18, V3#11, #27, #35 y #36), una sería de tipo pO113, y la otra sería de identidad variable. Es decir, los aislados V1#18 y V3#11 tienen una relaxasa pO113-like, pero también cargan con una relaxasa tipo R64, mientras que los aislados V3#27, #35 y #36 cargan cada uno con una relaxasa tipo pO113 y una adicional de tipo pSC138. Por otra parte, además de V3#27, #35 y #36, hay otros 17 amplicones con relaxasas tipo pSC138. Estos son en su mayoría aislados de la colección de multirresistentes (13/57). Y, además del aislado V3#11, hay otros cuatro aislados con una relaxasa tipo R64 (identificados por *array* en suspensión), así como otros cinco con un amplicón P12 98% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la relaxasa del plásmido pSE11-1 (identificados por secuenciación). Por último, hay dos aislados, donante y transconjugante (V3#15 y #16) que portan una relaxasa de tipo R387.

Otros miembros de las distintas subfamilias MOB_P también fueron identificados. El grupo más numeroso tras P12 es P51 (19/85), de las que 17/19 eran idénticas a la relaxasa del plásmido pLG13, un

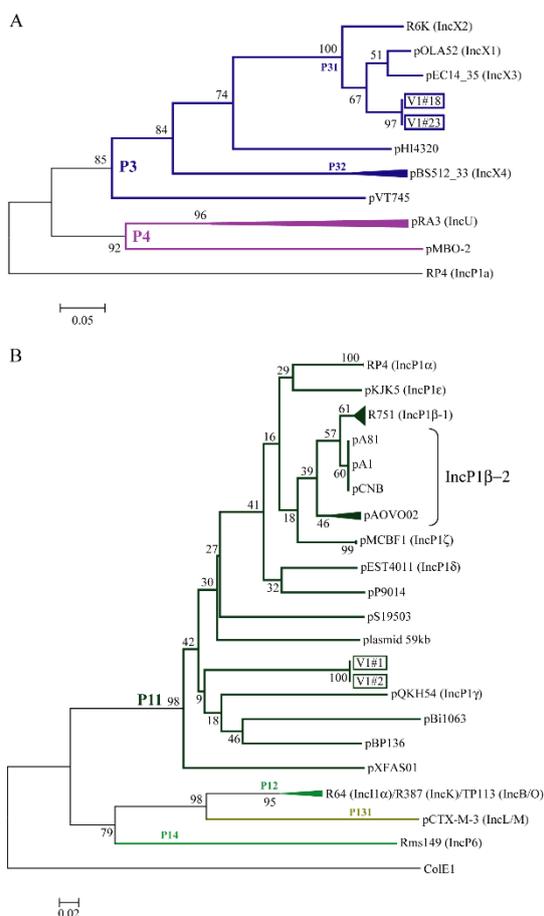


Figura 3.3.H. Filogenias de dos de las subfamilias MOB_p añadiendo las relaxasas P3⁺ y P11⁺ de la colección Valdecilla. Esta filogenia se ha reconstruido como ya se ha indicado (Sección 2) salvo que aquí hemos utilizado únicamente el fragmento amplificado por las correspondientes sondas DPMT (de unos 47 y 57 aminoácidos de longitud, respectivamente) de manera que la topología de la misma puede variar respecto a las presentadas en la Sección 3.1. Se han comprimido los *cluster* no esenciales de cada filogenia para aportar claridad. Se proporcionan ejemplos de plásmidos representativos para ayudar a la interpretación de la figura. Más información sobre las filogenias originales en la Sección 3.1. Las nuevas relaxasas mencionadas en el texto aparecen recuadradas.

respectivamente) encontramos una relaxasa semejante en un 74% a la del plásmido de *Comamonas testosteroni* p12 (NC_016978) en secuencia de aminoácidos. p12 es un plásmido ambiental catabólico, nativo de la β -proteobacteria *Comamonas testosteroni*, capaz de degradar cloroanilina [270] (figura 3.3.H.).

Las relaxasas de la familia MOB_F (45/153) consisten en un único amplicón F11 (V3#37) y otros 44 F12 (figura 3.3.G.). Secuenciamos el amplicón F11, resultando idéntico al 45.6% con la secuencia de aminoácidos de la relaxasa del plásmido R46 (del mismo modo, exhibe una identidad del 98.4% con la relaxasa del aislado TC1#69, de la colección del Hospital Universitario Ramón y Cajal). El aislado V3#37 carece de un replicón de tipo IncN1, igual que ocurría en el caso de TC1#69. Incluimos V3#37 en el grupo designado para un análisis posterior (Sección 3.5.).

Once muestras F12⁺ fueron secuenciadas, con los resultados siguientes: 8 relaxasas idénticas a la de R100, 2 idénticas a la del plásmido pAPEC-O1-ColBM y 1 idéntica a la del plásmido pVM01. Las 33 restantes fueron identificadas por medio del array en suspensión como semejantes a la relaxasa del plásmido R100 (IncFII). Este resultado indica la predominancia de este tipo de relaxasas entre las enterobacterias

plásmido MOB_{P51} que no es amplificable por PBRT. Estos datos concuerdan con la clasificación por PBRT disponible, excepto en los casos V1#20, #22 y #31. Los dos amplicones restantes son idénticos a la secuencia de la relaxasa del plásmido pCKO2, quien es otro miembro de MOB_{P51}, no amplificable por PBRT. Sin embargo, ambos aislados (V3#27 y #37) tienen replicones tipo ColE1.

La ausencia de amplicones ColE en aislados P51⁺ puede explicarse porque el plásmido pLG13 no hibrida correctamente con los cebadores PBRT correspondientes. Por otra parte, la presencia de un replicón ColE en un aislado P51 negativo se explica por el uso de una polimerasa no libre de ADN durante la clasificación por PBRT. Dado que los vectores de expresión de esta polimerasa son de tipo ColE1, se producen falsos positivos con los cebadores PBRT correspondientes a este replicón. La repetición de la PCR con una polimerasa libre de ADN demuestra este hecho [269].

De las 6 relaxasas amplificadas con las sondas P31-f+P31-r, hay cuatro (V3#19, #21, #23 y #31) idénticas a la relaxasa del plásmido pOLA52, mientras las otras dos (V1#18 y #23) son un 93.6% idénticas a la misma (figura 3.3.H.). Por último, la secuenciación de las relaxasas P11⁺ arrojó los siguientes resultados: por una parte, en V1#13 encontramos una relaxasa igual a la del plásmido RP4; por la otra, en V1#1 y #2 (donante y transconjugante,

Sección 3

hospitalarias. De entre todos los aislados, solo el transconjugante V1#16 carece de un replicón del complejo F que se ajuste al resultado obtenido por DPMT.

Encontramos 15 amplicones del tipo MOB_{Qu} entre los 76 aislados de esta colección. Al secuenciarlos, obtuvimos secuencias de aminoácidos idénticas a diferentes plásmidos dentro del grupo MOB_{Qu} (figura 3.1.E.): 10/15 amplicones idénticos a la relaxasa del plásmido pIGWZ12 y 5/15 idénticos a la del plásmido ColE9-J.

La familia MOB_H tiene 7/153 representantes en la colección Valdecilla (figura 3.3.G.), divididos en 1 amplicón del tipo H11 y 6 del tipo H121. El amplicón H11 fue identificado con el array en suspensión, hibridando con la sonda H112, por lo que será semejante a la relaxasa del plásmido IncHI2, R478. Sin embargo, en el aislado que porta esta relaxasa (V3#33) no se encontraron replicones H11 ni H12. Los amplicones H121, por otro lado, fueron secuenciados y todos ellos resultaron iguales a la relaxasa del plásmido modelo IncA/C, pSN254. Estas seis relaxasas están relacionadas a replicones detectados del tipo A/C, como era de esperar.

Para terminar, señalaremos que detectamos una relaxasa de tipo MOB_{C12} (aislado V3#1). Su secuencia de aminoácidos es idéntica al 99% con la de una potencial relaxasa de la isla de patogenicidad ICEKp1, de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NTUH-K2044 (AB298504). Fuimos incapaces de encontrar esta misma relaxasa en el transconjugante del que disponíamos (V3#2) e incluso repitiendo el ensayo de conjugación no fuimos capaces de encontrar un transconjugante con esta relaxasa.

Colección del Hospital de Umeå (Suecia)

La clasificación de los plásmidos de esta colección con los 19 cebadores DPMT arrojó un total de 77 amplicones (figura 3.3.I.). La distribución de los mismos en las distintas familias MOB es la siguiente: 33/77 amplicones de tipo MOB_P, 30/77 amplicones de tipo MOB_F, 9/77 amplicones MOB_C, 4/77 amplicones MOB_Q y 1/77 amplicón MOB_H. Dentro de la familia MOB_P encontramos 18/33 amplicones P51, 6/33 amplicones P12, 7/33 amplicones P3 y 2/33 amplicones P11. Identificamos los de tipo P12 por medio de secuenciación y observamos que la relaxasa más frecuente (4 de los 6 casos) era semejante a la del plásmido IncK R387. En el aislado A#3100 se obtuvieron secuencias de baja calidad reiteradamente y se desistió de repetir el proceso por no ser relevante para los objetivos pactados con el laboratorio de origen. Finalmente, encontramos un amplicón con una secuencia 80% idéntica (en aminoácidos) a la del plásmido R387 (aislado A#3201).

Los amplicones P3 fueron secuenciados, resultando iguales al 100% a la relaxasa de pOLA52 (IncX1). Por último, secuenciamos los dos amplicones P11, viendo que sus secuencias eran idénticas a la de la relaxasa del plásmido R751 (modelo del grupo IncP1β).

Sección 3

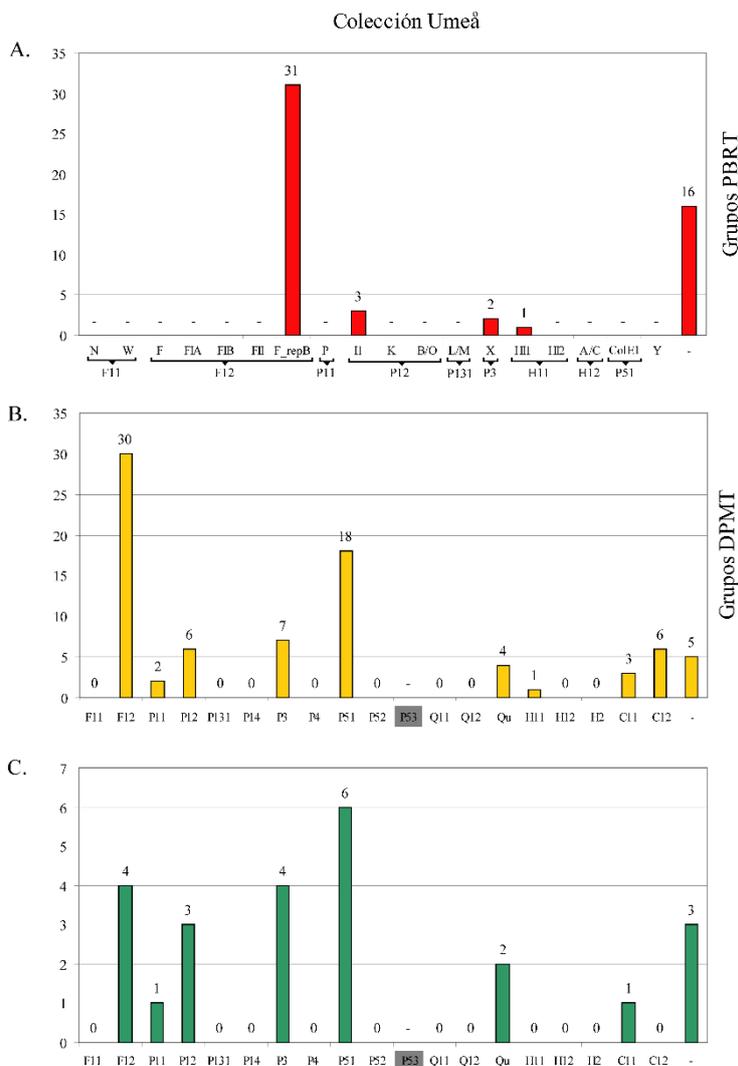


Figura 3.3.I. Resultados de la clasificación de la colección Umeå con el método DPMT. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos en la misma colección de aislados. Cada categoría del eje de abscisas representa una pareja de cebadores de cada uno de los dos métodos. La gráfica A. detalla los resultados obtenidos con el método PBRT; bajo las categorías de cebadores PBRT se indica qué cebadores DPMT amplifican las relaxasas de estos plásmidos. La gráfica B. detalla los resultados obtenidos con el método DPMT. La gráfica C. indica los resultados del método DPMT sobre los aislados PBRT negativos. En todos los casos, el número de amplicones obtenidos se indica sobre cada barra. Las categorías con un guión como valor en la gráfica indican que no se utilizó la pareja de cebadores correspondiente. La última barra de cada gráfica indica el número de aislados inconclusivos en cada uno de los dos métodos. Obsérvese que DPMT deja sin clasificar la tercera parte de aislados de los que deja PBRT. Las categorías sombreadas en gris en el eje de abscisas indican los cebadores DPMT no disponibles para esta colección. Para más detalles sobre cada aislado, véase la tabla suplementaria 6.

Secuenciamos los 30 amplicones obtenidos con las sondas *F12-f+F1-r*, con los siguientes resultados: 12/30 relaxasas tipo R100 (IncFII), 9/31 relaxasas tipo F (IncFI), 4/30 tipo R1 (IncFII), 2/30 tipo pAPEC-O1-ColBM [271] y 1/30 idéntica a la relaxasa del plásmido pSFxv_1 [272]. Para tres amplicones se obtuvieron datos de muy poca calidad reiteradamente, con lo que no fueron secuenciados dada su escasa representatividad en la colección. Los datos de clasificación por DPMT concuerdan con los de PBRT, excepto los aislados A#3031, #3171, #3263 y #3315, que carecen de replicón del complejo de replicación F (tabla suplementaria 6).

Los cuatro amplicones MOB_Q pertenecen a la subfamilia Qu. Secuenciamos estos amplicones, resultando en las siguientes identidades: 2/4 relaxasas idénticas a la del plásmido críptico pIGWZ12, 1/4 idéntica a la de pMG828-2 y el elemento más interesante, 1/4 relaxasa, idéntica al 62.5% con la secuencia de aminoácidos de la del plásmido pIGMS5 (figura 3.1.E.). Finalmente, el aislado A#3318 contiene una relaxasa MOB_{H11} que, secuenciada, resultó idéntica al 100% a la secuencia del plásmido IncHI2 R478.

3.4. Análisis de las cepas sin relaxasa detectable

Acabamos de exponer que, de un total de 339 cepas clínicas y ambientales analizadas, 18 de ellas no pudieron ser amplificadas con las sondas DPMT. Este grupo de aislados contiene tanto cepas originales como transconjugantes obtenidos en los laboratorios de origen de cada uno de ellas. Este número representa un 5.3% del total. De las 18 cepas, 8 de ellas (los aislados sin relaxasa de la colección del Hospital Sant Pau y la Santa Creu, SP#27D, #34D, #44D, #65D, #72D y #93D y el aislado del Hospital de Umeå A#3450) eran incapaces de conjugarse, según el laboratorio de origen y, por tanto, no fueron consideradas para esta parte de los experimentos. En cuanto a los restantes 10 aislados, algunos pudieron clasificarse según el (o los) replicón presente en ellos en sus laboratorios de origen. Por ejemplo, en G#203 se encontró un replicón parecido a los del grupo IncW, pero fue por secuenciación del gen *repA* y el área circundante como se obtuvo esta conclusión [134]; 6 aislados (TC1#27, #34, #50, #52, #75 y TC2#23) tienen entre uno y tres replicones, de las clases N1, FrepB, FII, P, II, K y A/C; finalmente, a los tres aislados del Hospital de Umeå incluidos no se les encontró un grupo de replicación, probablemente por la escasez de sondas PBRT que usaron en su caracterización inicial (tabla 3.4.A.).

Consideración aparte merecen las cepas que contienen únicamente una relaxasa propia de plásmidos movilizables. Escogimos incluir en el análisis cuatro aislados de la colección del Hospital Ramón y Cajal (TC1#65, #68, #72 y #73), porque únicamente pudimos amplificar en ellos relaxasas tipo P51, de plásmidos movilizables. Estos cuatro aislados, excepto TC1#65, son capaces de producir transconjugantes, lo cual indica que estamos pasando por alto relaxasas de algún tipo. Además, TC1#65 y #68 no pueden clasificarse por PBRT, mientras que TC1#72 y #73 son clasificados en los tipos X2 y N1, respectivamente (tabla 3.4.A.).

Partiendo de 14 cepas potencialmente conjugativas, obtuvimos 13 cepas transconjugantes en total. En el caso del aislado G#203 no obtuvimos transconjugantes, por lo que decidimos secuenciar completamente el plásmido que contenía (ver Sección 3.5.). En 5 de ellos solo se transmite una resistencia (Ap), mientras que en las 8 restantes vemos la transferencia de entre 2 y 6 resistencias (ver tabla 3.4.A.). Con el ADN de los 13 transconjugantes restantes, repetimos el análisis con las 19 parejas de sondas DPMT. Únicamente en A14134 amplificamos una relaxasa propia de un plásmido conjugativo, que es del tipo P12. Identificamos este amplicón por medio del array en suspensión, viendo que se trataba de una relaxasa tipo R387, el plásmido modelo del grupo IncK, lo que coincidía con el contenido en replicones del aislado original. En el resto de transconjugantes no se encontraron relaxasas de plásmidos conjugativos ni movilizables, excepto en los casos de A14165, A14168, A14172 y A14173, en los que se encontraron sendas relaxasas P51, presentes también en los donantes originales.

Los 12 aislados conjugativos sin relaxasa detectable fueron cribados, en función del tamaño de sus plásmidos, para su secuenciación completa por distintos medios. Escogimos aquellos con tamaños menores o iguales a 50 kb, dado nuestro interés en plásmidos de pequeño tamaño, capaces de producir transconjugantes y con relaxasas no descritas con anterioridad o no detectadas por DPMT. Por tanto, escogimos los aislados A14127, A14168, A14173 y A15223 (Ramón y Cajal) que respondían a estas características, junto con A13111 y A12061 (Umeå) de tamaño desconocido, pero con el resto de características descritas y el plásmido pBFp1, del aislado G#203 que, aunque incapaz de conjugarse, resulta de interés por tener descrito un replicón tipo IncW [134].

Sección 3

secuencias invertidas de 12 pb, separadas por un *loop* de 2 pb, un espaciador de 3 pb y la secuencia diana de corte (GTGT[^]ATA), conservada en todos los plásmidos IncN1 (no mostrado). Separando los módulos MOB y MPF encontramos una transposasa truncada de un transposón de tipo Tn3 y dos genes de función desconocida. Sus productos son homólogos de proteínas del plásmido de *P. aeruginosa* pUM505 (la transposasa) [245] y pEC_L46 (las proteínas hipotéticas) [274]. Esta estructura es la misma que encontramos en el plásmido pEC_L46, salvo por la presencia de la transposasa y la ausencia de secuencias repetidas en sus extremos.

Tabla 3.4.B. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA14168a

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
oriD	123	Proteína hipotética p9_p53 del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63151	8,30E-65	100% (100%)
stbC	123	StbC del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_003829313	1,15E-72	100% (100%)
stbB	239	StdB del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_003829312	7,78E-175	100% (100%)
stbA	129	StbA del plásmido pEC_L46	ABU86820	1,73E-85	100% (100%)
traK	139	Proteína accesoria del plásmido pKP96	YP_002332895	1,14E-99	100% (100%)
traJ	526	Proteína acoplador del plásmido pEC_L46	ADL14203	0	100% (100%)
traI	1080	Nickasa/helicasa TraI del plásmido pEC_L46	ADL14202	0	100% (100%)
flpA	134	Proteína de inhibición de la fertilidad FlpA, plásmido pEC_L46	ADL14201	1,37E-97	100% (100%)
tnpA1	130	Transposasa truncada TnpA del plásmido pUM505	AFQ93485	1,17E-65	98% (99%)
hp1	192	Proteína hipotética pEC146p117 del plásmido pEC_L46	ADL14200	3,66E-113	100% (100%)
hp2	129	Proteína hipotética pEC146p116 del plásmido pEC_L46	ADL14199	1,25E-92	100% (100%)
nuc	185	Endonucleasa de la transferencia conjugativa Nuc, del plásmido pKOX_R1	YP_006501590	1,62E-118	100% (100%)
traG	333	ATPasa del T4SS del plásmido pEC_L46	ADL14198	0	100% (100%)
traF	388	Proteína del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	ADL14197	0	100% (100%)
traO	307	Proteína del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	ADL14196	0	100% (100%)
traE	240	Proteína translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829301	0	100% (100%)
traN	53	Proteína del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829300	1,00E-34	98% (100%)
traD	347	Proteína translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pKP96	YP_002332883	0	100% (100%)
cep	105	Proteína de exclusión de entrada del plásmido pEC_L46	ADL14192	3,91E-74	100% (100%)
traC	255	Proteína asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pKOX105	YP_003829297	1,25E-143	100% (100%)
traB	868	ATPasa del T4SS del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63171	0	100% (100%)
traA	115	Proteína translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pEC_L46	ADL14189	2,64E-80	100% (100%)
traM	98	Proteína asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002287007	9,66E-65	100% (100%)
korA	98	Proteína KorA del plásmido pEC_L46	ADL14187	5,95E-68	99% (100%)
traL	246	Proteína asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	ADL14186	1,98E-166	100% (100%)
korB	126	Proteína KorB del plásmido pKOX105	ABG49214	4,58E-76	100% (100%)
orf1	117	Proteína hipotética pKlebeu9_p80 del plásmido p9 , de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63178	2,50E-68	100% (100%)
kikA	129	Proteína hipotética pEC146p102 del plásmido pEC_L46	ADL14185	9,80E-95	100% (100%)
orf2	104	Proteína hipotética pEC146p101 del plásmido pEC_L46	ADL14184	3,04E-70	100% (100%)
mrr	264	Proteína Mrr del plásmido pKOX105	ADH29505	8,32E-161	100% (100%)
insB	89	Proteína InsB del elemento de inserción IS1	YP_002286922	5,31E-61	100% (100%)
ecoRIIm	502	ADN (citosin-5-)-metiltransferasa EcoRIIm del plásmido pLEW517	ABG49221	0	100% (100%)
ecoRIIrr	405	Enzima de restricción EcoRII, del plásmido pKOX105	YP_003675731	0	100% (100%)
resP	195	Resolvasa del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286932	2,15E-124	100% (100%)
repA	240	Proteína iniciadora de la replicación RepA del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63128	1,22E-180	100% (100%)
ardK	154	Proteína de antirestricción ArdK, plásmido pEC_L46	ADL14210	7,65E-111	100% (100%)
mpr	277	Metaloproteasa Mpr del plásmido pEC_L46	ADL14211	0	100% (100%)
mucB	435	ADN polimerasa de actividad dirigida por ADN MucB, plásmido pEC_L46	ADL14212	0	100% (100%)
mucA	149	Proteína LxA-like, MucA, del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI62996	2,75E-97	100% (100%)
ardB	143	Proteína de antirestricción ArdB del plásmido pEC_L46	ADL14214	7,51E-105	100% (100%)
ardR	142	Proteína de antirestricción ArdR del plásmido pEC_L46	ADL14215	1,24E-97	100% (100%)
cegEIII	80	Proteína hipotética CegEIII del plásmido R46	YP_002286941	1,90E-51	100% (100%)
hp3	90	Proteína hipotética pKlebeu9_p38 del plásmido p9 , de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63136	1,52E-18	100% (100%)
hp4	82	Proteína hipotética pK245.entp40 del plásmido pK245	ABG56823	3,51E-20	92% (100%)
hp5	77	Proteína hipotética pKlebeu9_p29 del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63127	1,28E-34	100% (100%)
tnpA2	108	Transposasa del elemento de inserción IS8	ACI63126	1,25E-75	99% (100%)
uvrA	903	Subunidad A de la excinucleasa ABC del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63125	0	100% (100%)
hp6	40	Proteína hipotética pKlebeu9_p25 del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	ACI63123	2,57E-25	100% (100%)
orfB1	213	Proteína OrfB del elemento de inserción IS6100	CBY98959	3,37E-123	88% (91%)
tnpA3	364	Transposasa del elemento IS110	YP_002286848	0	100% (100%)
blaTEM-142	287	b-lactamasa TEM-142	ABD60314	0	100% (100%)
tnpR1	209	Resolvasa del transposón Tn3	CAQ48346	4,61E-149	100% (100%)
tnpA4	1025	Transposasa del transposón Tn3	ADB84936	0	100% (100%)
tnpR2	86	Resolvasa del transposón Tn6901	ACI63111	4,16E-53	98% (100%)
esterase	280	S-formylglutatin hidrolasa del transposón Tn6901	ACI63112	0	100% (100%)
ble	133	Proteína de resistencia a glyoxilasa/bleomicina	ACI63113	9,61E-86	100% (100%)
adhIII	376	Alcohol deshidrogenasa de clase III	ZP_07950450	0	100% (100%)
frmR	92	Proteína reguladora FrmR	ZP_07950451	5,42E-63	97% (100%)
orfB2	168	Proteína OrfB, transposasa del elemento de inserción IS1	YP_001881169	1,03E-110	99% (100%)
insA	92	Proteína InsA, transposasa del elemento de inserción IS1	CAA11401	1,28E-63	97% (100%)
hp7	87	Proteína hipotética pKOX105p26 del plásmido pKOX105	ADH29525	1,11E-34	86% (100%)

- Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- Proteína homóloga más próxima.
- Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Tabla 3.4.C. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA14173a.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
ardB	143	Proteína de antirestricción ArdB del plásmido R46	YP_724515	7,44E-105	99% (100%)
ardK	154	Proteína de antirestricción ArdK del plásmido R46	YP_724519	1,40E-110	99% (100%)
ardR	142	Proteína de antirestricción ArdR del plásmido R46	AAB36888	5,74E-97	99% (99%)
ccgEIII	80	Probable proteína de antirestricción CcgEIII del plásmido R46	YP_002286941	1,94E-51	99% (100%)
hpl	100	Proteína hipotética del plásmido pCU1	AAA98072	3,11E-70	100% (100%)
mpr	277	Metaloproteasa Mpr del plásmido pLEW517	ABG49226	0	100% (100%)
mucA	152	Proteína LexA-like, MucA, del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	AC162996	3,95E-100	100% (100%)
mucB	435	ADN polimerasa de actividad dirigida por ADN MucB, plásmido pMUR050	YP_724517	0	99% (100%)
repA	240	Proteína iniciadora de la replicación, RepA, del plásmido pMAK2	YP_001551827	1,89E-180	100% (100%)
ecoRIIm	567	ADN (citosin-5-)-metiltransferasa EcoRIIm del plásmido pLEW517	ABG49221	0	100% (100%)
ecoRIIr	405	Enzima de restricción EcoRII, del plásmido pKOX105	YP_003675731	0	100% (100%)
resP	199	Resolvasa del plásmido R46	YP_724462	9,35E-132	100% (100%)
eep	116	Proteína de exclusión de entrada del plásmido pFC_L46	YP_003829298	3,04E-62	86% (93%)
fipA	210	Inhibición de a fertilidad de los plásmidos IncP, de pKM101	AAAC63100	5,84E-157	100% (100%)
kikA	105	Proteína KikA del plásmido pMUR050	YP_724486	2,87E-75	100% (100%)
korA	94	Proteína KorA del plásmido pMUR050	YP_724490	2,64E-65	100% (100%)
korB	126	Proteína KorB del plásmido pF.EW517	ABG49214	1,72E-78	100% (100%)
mrr	264	Probable endonucleasa de restricción del plásmido pKOX105	YP_003675733	5,53E-159	100% (100%)
nuc	185	Endonucleasa Nuc del plásmido pKOX_R1	YP_006501590	2,58E-116	98% (99%)
orf1	128	Proteína hipotética pMUR050_030, del plásmido pMUR050	YP_724487	1,67E-64	100% (100%)
orf2	104	Proteína hipotética R46_004 del plásmido R46	NP511182	8,22E-70	100% (100%)
stbA	177	StbA del plásmido pMUR050	YP_724507	2,47E-102	100% (100%)
stbC	123	StbC del plásmido pMUR050	YP_724509	5,44E-73	100% (100%)
stdB	239	StdB del plásmido pMUR050	YP_724508	4,62E-175	100% (100%)
traA	115	Proteína translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pKOX105	YP_003675740	2,68E-80	99% (100%)
traB	868	ATPasa del T4SS del plásmido pMAK2	YP_003717495	0	100% (100%)
traC	255	Proteína asociada al pilus del T4SS del plásmido pKOX105	YP_003717496	7,85E-153	94% (98%)
traD	347	Proteína translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pMUR050	YP_724496	0	100% (100%)
traE	240	Proteína translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829301	0	100% (100%)
traF	388	Proteína TraF (T4SS) del plásmido pMUR050	YP_724500	0	100% (100%)
traG	333	ATPasa del T4SS del plásmido pMUR050	YP_724501	0	100% (100%)
traI	1080	Relaxasa del plásmido pMUR050	YP_724504	0	100% (100%)
traJ	526	Proteína acopladora, ATPasa del plásmido pFC_L46	ADI_14203	0	100% (100%)
traK	139	Proteína accesoria del relaxosoma del plásmido pMUR050	YP_724506	1,54E-99	100% (100%)
traL	245	Proteína asociada al pilus del T4SS del plásmido pMUR050	YP_724489	6,52E-166	100% (100%)
traM	98	Proteína asociada al pilus del T4SS del plásmido pMUR050	YP_724491	5,51E-65	100% (100%)
traN	90	Proteína TraN (T4SS) del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	AC163050	5,73E-35	100% (100%)
traO	307	Proteína TraO (T4SS) del plásmido pEC_L46	YP_001551804	0	99% (100%)

- a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- c. Proteína homóloga más próxima.
- d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

De pA14173q y pA14173_MOBV5 tenemos una secuencia ensamblada de cada uno, de 3612 y 2736 pb respectivamente. La media de lecturas para cada posición nucleotídica de estas dos secuencias es de 53.8X y 4.8X, respectivamente. En las tablas 3.4.C.-E. presentamos la relación de ORF detectados en los fragmentos de los tres plásmidos de A14173, mientras que en las figuras 3.4.B.-D. representamos sus mapas genéticos.

En el fragmento 1 del plásmido pA14173a encontramos los módulos STB, MOB y MPF, junto con los genes REG *korA* y *korB*. No hay genes accesorios insertados entre MOB y MPF. El fragmento 2 contiene tres genes, *ecoRIIm*, *ecoRIIr* (MOD) y *resP* (REP). Por último, el fragmento 3 contiene los genes *repA*, *mpr*, *mucB* y *mucA*, genes de un incompleto EST (*ardB*, *ardR* y *ccgEIII*) y el gen de regulación transcripcional *ardK*. Todos los productos de estos genes son idénticos a los de otros plásmidos MOB_{F112}/IncN1 (tabla 3.4.C.).

Tabla 3.4.D. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA14173q.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
hp1	71	Proteína hipotética pColE1_04 del plásmido ColE1	NP_040359	2,00E-41	94% (97%)
blaTEM-1	287	Proteína de resistencia a β-lactámicos BlaTEM-1	NP_569411	0	100% (100%)
hp2	98	Proteína hipotética de 10.2 kd del plásmido ColE1	NP_040359	31E-38	94% (96%)
hp3	102	Proteína hipotética pU302Sp01, del plásmido pU302S	AAAR02632	7,42E-72	100% (100%)
hp4	61	Proteína hipotética del plásmido pEC34B	EIG91830	6,42E-21	95% (97%)
rop	75	Proteína reguladora Rop del plásmido pSL491_5	ACH87663	2,89E-52	100% (100%)
mbeC	125	Proteína accesoria de la conjugación MbeC del plásmido ColE1	YPB1_ECOLI	1,42E-80	100% (100%)
tetA	208	Proteína de expulsión de tetraciclina TetA	NP_444549	7,35E-145	100% (100%)

- a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- c. Proteína homóloga más próxima.
- d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

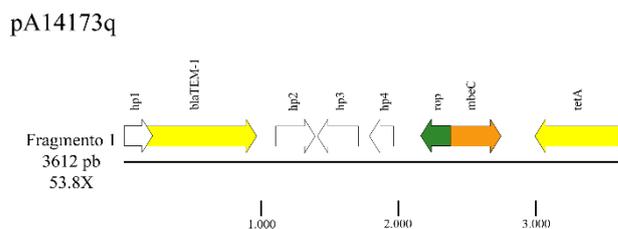


Figura 3.4.C. Mapa genético del plásmido (incompleto) pA14173q. La leyenda es la misma que en la figura 3.3.A.

El primero de los plásmidos movilizables de A14173 se denomina pA14173q y es de tipo MOB_{P51}. Contiene 8 ORFs (figura 3.4.C.) distribuidos entre los módulos VAG, REP y MOB. Los genes VAG proporcionan resistencia a antibióticos (a β-lactamasas y a

tetraciclinas). El gen *rop* regula el número de copias de este tipo de plásmidos estabilizando la unión de ARNII y ARNI [278]. Estos elementos reguladores se encuentran contenidos en la secuencia del gen *hp2*, con una homología de secuencia del 100% a la del plásmido ColE1 (no mostrado). Encontramos el gen *mbeC*, que pertenece a MOB. Codifica una proteína accesoria implicada en la movilización de los plásmidos tipo ColE1 [279]. La relaxasa de este plásmido no aparece en la secuencia obtenida, aunque sabemos que existe una de tipo P51 en este aislado (tabla 3.4.A.). El gen *tetA* aparece insertado en el sitio en el que debería comenzar la relaxasa. Los porcentajes de identidad de sus secuencias de aminoácidos están entre el 94% y el 100% (tabla 3.4.D.).

El tercer plásmido pertenece al grupo MOB_{V5}, para el que no se han diseñado sondas DPMT en el presente trabajo. El plásmido completo contiene dos genes, una relaxasa (*mob*) y una putativa proteína iniciadora de la replicación (*rep*). La relaxasa contiene el motivo conservado III propio de las relaxasas MOB_{V5}, DE-x₃-H-x-H [2]. También, de acuerdo con la estructura de la región MOB de estos plásmidos [1], se pudo localizar el potencial *oriT* de este plásmido, aguas arriba del inicio de *mob*. Consta de dos IR de 6 bases de largo, separadas por un lazo de 8 (no mostrado). Esto se desvía ligeramente del *oriT* consenso descrito para otros MOB_V [1], que tiene unas IR de entre 10 y 7 bases y un lazo de 6. La proteína iniciadora de la replicación pertenece a la superfamilia de reguladores protéicos HTH_CRP, involucrados en la activación de la transcripción [280]. La identidad de los productos de estos dos genes con sus homólogos más próximos está entre el 46% y el 61% (figura 3.4.D.).

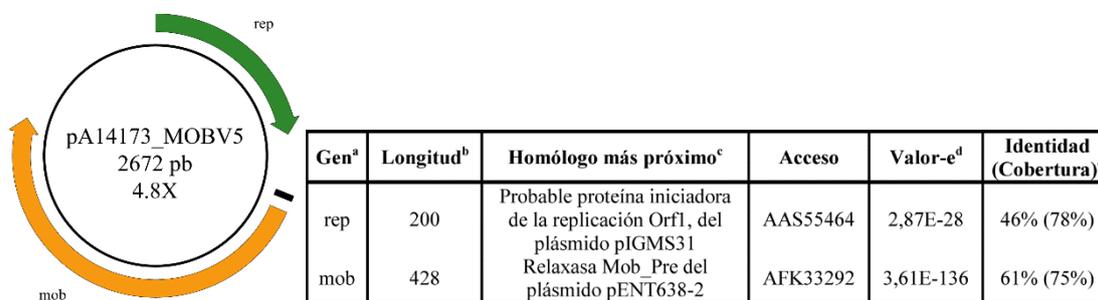


Figura 3.4.D. Mapa genético del plásmido pA14173_MOBV5 y tabla de los homólogos más próximos de sus productos protéicos. A la izquierda; el rectángulo negro indica la posición del *oriT*. El resto de colores y figuras, igual que en la figura 3.4.A. A la derecha:

- a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- c. Homólogo más próximo detectado.
- d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homólogo más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Tabla 3.4.E. Genes encontrados en el plásmido pA15223q_ColE1

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
hp1	102	Proteína hipotética pU302Sp01	AAR02632	7,42E-72	100% (100%)
hp2	70	Proteína hipotética pColE1_10	AAB59129	2,63E-44	96% (96%)
rop	54	Proteína reguladora Rop del plásmido pSL491_5	ACII87663	2,51E-35	100% (100%)
mbeC	116	Proteína de movilización Mob2 del plásmido ColE1	YP_002221409	1,45E-80	100% (100%)
mbeA	534	Relaxasa del plásmido pC	AAL87017	0	100% (100%)
mbeB	173	Proteína de movilización Mob6 del plásmido ColE1	P13659	5,76E-125	100% (100%)
mbeD	75	Proteína exclusión de entrada del plásmido ColE1	ZP_07218423	8,65E-48	100% (100%)
mbeE	54	Proteína MobE del plásmido pEC158	EIG41045	5,51E-36	100% (100%)
exc1	146	Proteína hipotética del plásmido ColE1	AAB59142	6,80E-84	99% (100%)
exc2	140	Proteína hipotética del plásmido ColE1	YP_001139963	9,81E-105	100% (100%)
cea	523	Colicina E1 del plásmido ColE1	AAN76832	0	100% (100%)
imm	114	Proteína de inmunidad a colicina E1 del plásmido ColE1	P02985	4,90E-65	100% (100%)
kil	46	Proteína de lisis de la colicina E1 del plásmido ColE1	AAN76834	3,76E-29	100% (100%)
hp3	97	Proteína hipotética pColE1_04	AAB59124	8,84E-67	99% (100%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

En el aislado A15223 encontramos dos plásmidos, uno del complejo de replicación F y otro de tipo MOB_{P5}/ColE1. Del primero no obtuvimos secuencias de su MOB ni MPF y no lo vamos a comentar. El segundo plásmido es de tipo MOB_{P51} (figura 3.4.E.). Consta de 6648 pb, con una cobertura media de 318.01X por posición. Codifica una relaxasa, *mbeA*, 100% idéntica a la del plásmido ColE1 (tabla 3.4.E.). Además, encontramos el gen *mbeC* y otros genes supuestamente accesorios de la conjugación [279], un gen de exclusión de superficie (*mbeD*) y un sistema de producción, transporte e inmunidad de colicina E1 (*cea*, *kil* e *imm*, respectivamente).

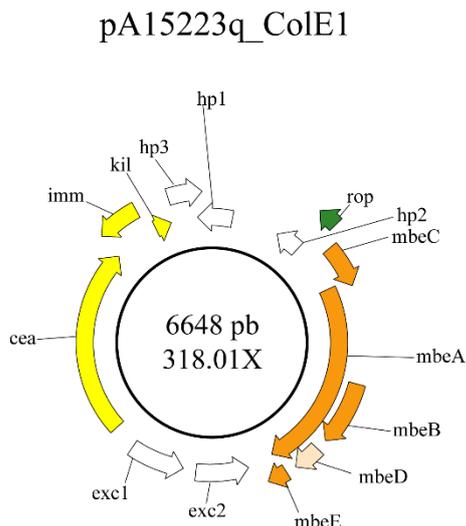


Figura 3.4.E. Mapa genético del plásmido pA15223q_ColE1. La leyenda es igual a la de la figura 3.3.A.

Sección 3

Tabla 3.4.F. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA13111o.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
hp1	122	Proteína hipotética, probable GMP sintasa del plásmido p2ESCUM	YP_002381224	6,65E-82	100% (100%)
hp2	139	Probable lisozima de la cola del fago T4, del plásmido pBS512_33	YP_001878793	1,03E-92	99% (100%)
hp3	104	Proteína hipotética p2ECUMN_0040, del plásmido p2ESCUM	YP_002381222	8,21E-61	99% (100%)
hp4	91	Proteína hipotética p2ECUMN_0038, del plásmido p2ESCUM	YP_002381220	5,88E-64	99% (100%)
hp5	98	Proteína hipotética SeD_B0108, del plásmido pCT02021853_74	YP_002213938	9,89E-68	96% (99%)
taxA	212	Probable proteína accesoria del relaxosoma del plásmido p2ESCUM	YP_002381218	2,14E-143	100% (100%)
taxC	389	Relaxasa del plásmido p2ESCUM	YP_002381217	0	99% (100%)
actX	169	Probable proteína de control transcripcional ActX, del plásmido pEC14_35	AFC60923	1,18E-111	89% (93%)
hp6	76	Proteína hipotética p2ECUMN_0033 del plásmido p2ESCUM	YP_002381215	3,73E-34	100% (100%)
pilX1	231	Proteína VirB1 asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pMAS2027	YP_003292206	3,98E-145	96% (96%)
pilX2	122	Proteína VirB2 asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pDKX1-TEM-52	AFM46026	2,30E-70	99% (100%)
ΔpilX3/X4	803	Proteína de fusión (truncada) VirB3-B4, traslocadora de sustrato y ATPasa del T4SS del plásmido pE001; fragmento N-terminal	AEC32474	0	100% (100%)
insD	283	Integrasa del elemento de inserción IS2	NP_061399	0	100% (100%)
ΔpilX3/X4	131	Proteína de fusión (truncada) VirB3-B4, traslocadora de sustrato y ATPasa del T4SS del plásmido p3246_74; fragmento N-terminal	EGE28019	1,18E-83	98% (99%)
pilX5	253	Proteína VirB5 asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pE001	AEC32473	0	100% (100%)
ccx	76	Probable proteína de exclusión de superficie del plásmido pSE34	YP_001965340	2,18E-53	100% (100%)
pilX6	378	Proteína VirB6 traslocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pCT02021853_74	YP_002213929	0	99% (100%)
pilX8	238	Proteína VirB8 traslocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pOLA52	YP_001693197	5,11E-157	100% (100%)
pilX9	310	Proteína VirB9 del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pE001	AEC32469	0	100% (100%)
pilX10	377	Proteína VirB10 del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pOU1114	YP_001716077	0	100% (100%)
pilX11	337	Proteína VirB11 ATPasa del T4SS del plásmido pE001	AEC32467	0	100% (100%)
taxB	612	Proteína acopladora, ATPasa del T4SS del plásmido p2ESCUM	YP_002381204	0	100% (100%)
virB	138	Probable lipoproteína exportada, de la familia VirB/Trw/Tra, del plásmido pE001	AEC32465	2,47E-97	97% (99%)
trbM	101	Probable proteína TrbM/KikA del plásmido pSE34; probable proteína asesina	YP_001965349	2,01E-60	96% (100%)
hp7	86	Proteína hipotética p2ECUMN_0019 del plásmido p2ESCUM	YP_002381201	2,36E-60	99% (99%)
hp8	145	Proteína hipotética E001_27, probablemente exportada, del plásmido pE001	AEC32463	3,64E-95	99% (99%)
yeaA	178	Probable precursor de una endonucleasa del plásmido pDKX1-TEM 52	AFM46014	1,80E-116	98% (100%)
AAA-ATPasa	421	Probable AAA-ATPasa del plásmido pRPEC180_47	AFC60867	0	98% (99%)
topo3	717	Probable ADN topoisomerasa III del plásmido p2ESCUM	YP_002381195	0	95% (98%)
hns	167	Regulador transcripcional global del plásmido p2ESCUM	YP_002381193	6,41E-77	100% (100%)
hp9	219	Probable lipoproteína exportada del plásmido p2ESCUM	YP_002381192	8,53E-153	100% (100%)
hp10	144	Proteína hipotética del plásmido pJIE143	AHQ61785	1,56E-90	97% (97%)
res	297	Probable resolvasa, proteína D del plásmido p2ESCUM	YP_002381191	0	99% (100%)
parA	220	Proteína de partición YafB del plásmido p2ESCUM	YP_002381190	1,12E-165	100% (100%)
hp11	101	Probable represor transcripcional dependiente de Metionina, del plásmido p2ESCUM	YP_002381189	8,03E-41	100% (100%)
hp12	95	Probable proteína de membrana del plásmido p2ESCUM	YP_002381188	2,72E-66	100% (100%)
hp13	94	Probable proteína de membrana del plásmido p2ESCUM	YP_002381187	3,23E-49	100% (100%)
hp14	97	Probable proteína de membrana del plásmido pCROD2	CBG91838	1,01E-45	96% (97%)
taxD	155	Probable proteína de distorsión del ADN TaxD, del plásmido p2ESCUM	YP_002381185	4,20E-112	100% (100%)
bis	148	Probable proteína auxiliadora del inicio de la replicación, Bis, del plásmido p2ESCUM	YP_002381184	2,13E-97	100% (100%)
pir	331	Proteína iniciadora de la replicación del plásmido p2ESCUM	YP_002381183	0	100% (100%)

- Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- Proteína homóloga más próxima.
- Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Por último, pA15223q_ColE1 posee una secuencia *rop*, que controlaría el mecanismo de replicación del plásmido. Las secuencias de control de la replicación ARNI y ARNII se encuentran contenidas en el ORF *hp3*. La secuencia de este plásmido es idéntica al 99.7% a la de distintos plásmidos tipo ColE1.

En el aislado A13111 encontramos dos plásmidos, el primero de los cuales pertenece al complejo de replicación F. De nuevo, los fragmentos ensamblados no proporcionan información sobre los módulos MOB o MPF, de manera que no se hablará de él. El otro plásmido que encontramos (pA13111o; figura 3.4.F.) pertenece al grupo de replicación IncX1 (tabla 3.4.F.). La longitud total de la secuencia ensamblada

Sección 3

de pA13111o es de 30988 pb y la cobertura media de cada posición es de 22.9X.). Las secuencias ensambladas correspondientes a pA13111o codifican genes de los módulos MOB, MPF y REP, organizados según la arquitectura conservada de los plásmidos IncX1, como p2ESCUM y pOLA52 (figura 3.4.F.). La principal característica de este plásmido es que la secuencia de su módulo MPF queda interrumpida por la inserción de un elemento IS2 dentro del gen *pilX3/X4*. De IS2 solo sabemos que contiene el gen *insD* pero desconocemos su longitud total y si contiene algún otro gen (figura 3.4.F.).

En cuanto a *pilX3/X4*, su secuencia no ha sufrido deleción alguna asociada a la inserción de IS2. Al eliminar la secuencia de IS2 de los fragmentos 1 y 2 de pA13111o se puede reconstruir un gen *pilX3/X4* completo (no mostrado). Esta característica se puede observar también en el plásmido P31/IncX1 pLN126_33 (NC_019256), aunque en este caso se trata de un elemento tipo IS1 [13]. Además, el fragmento 1 contiene otros cuatro genes de los módulos MOB y MPF, así como una serie de genes de función desconocida (*hp1-hp6*), que son idénticos a proteínas de distintos plásmidos IncX1 (tabla 3.4.F.). El fragmento 2 contiene el T4SS del plásmido (MPF), *eex* (exclusión de superficie), *yeaA* (endonucleasa), además de una serie de genes que, junto con *pir*, podrían estar involucrados en el proceso de replicación (REP). Estos genes serían *AAA_ATPase*, *topo3*, *resolvase*, *taxD*, *bis* y el mencionado *pir*. Todos tienen una alta identidad con proteínas del plásmido p2ESCUM. Por último, tenemos un gen cuya función podría ser regular la expresión genética, *hms* y una serie de genes de función desconocida (*hp7-hp14*).

pA13111o

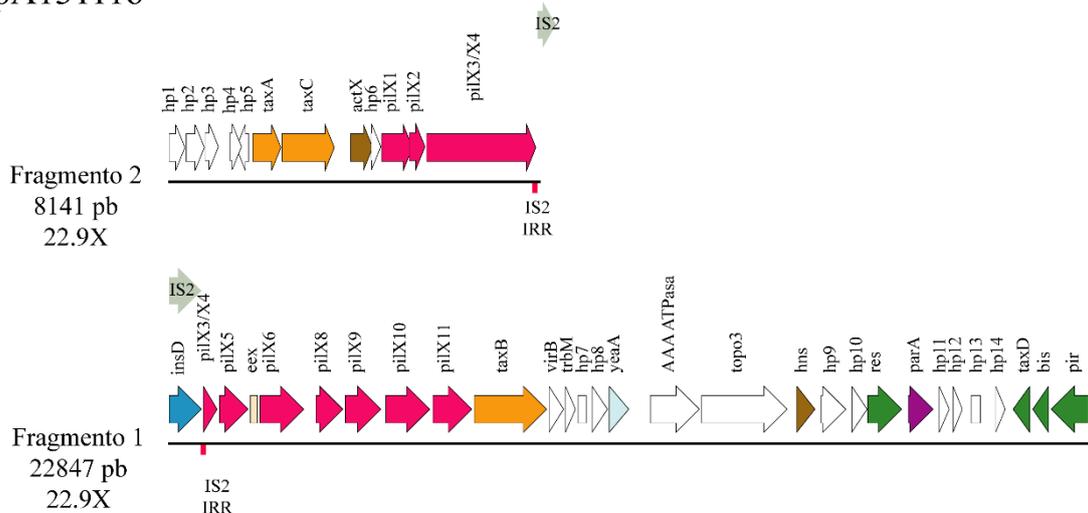


Figura 3.4.F. Mapa genético del plásmido (incompleto) pA13111o. La leyenda es igual que en la figura 3.3.A.

Sección 3

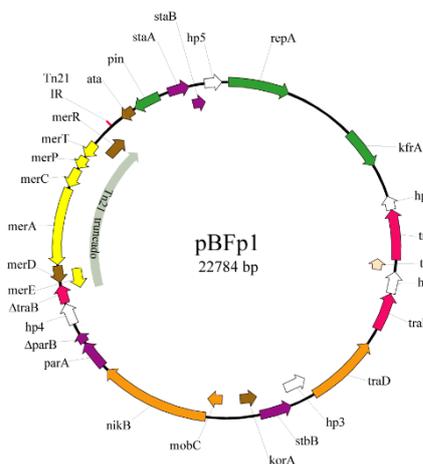


Figura 3.4.G. Mapa genético del plásmido MOB_{P6} pBFp1. La leyenda es idéntica a la expuesta en la figura 3.3.A.

El plásmido pBFp1, contenido en el aislado G#203 de la colección de la Universidad de Göteborg (tabla 3.3.A.) fue secuenciado por el parecido de su replicón con el de los plásmidos IncW [134]. Tiene un total de 22784 pares de bases, que codifican 29 genes, en 19008 de ellas (un 83.4% del total; tabla 3.4.G.). Catorce de las 29 proteínas del plásmido pBFp1 tienen por homólogas más próximas proteínas de pXap41, un plásmido de *X. arboricola* pv. pruni [281]. Los porcentajes de identidad de secuencia entre sus proteínas están entre el 46% y el 90% (tabla 3.4.G.), lo que sugiere una fuerte relación filogenética entre ellos. En cualquier caso, el plásmido pBFp1 consta de seis módulos funcionales, REP, STB, MPF, MOB, REG y VAG (figura 3.4.G.). La proteína relaxasa de este

plásmido es del tipo MOB_{P6}, una subfamilia de MOB_P cuyos miembros han sido aislados de diferentes entornos naturales, no relacionados con lo sanitario. El MPF de pBFp1 pertenece a la clase T y está incompleto.

Tabla 3.4.G. Genes encontrados en el plásmido pBFp1.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
repA	441	Proteína iniciadora de la replicación RepA del plásmido R7K	YP_001874895	0	49% (64%)
kfrA	293	Probable proteína KfrA del plásmido pIPO2T	NP_444542	3,45E-92	70% (73%)
hp1	101	Proteína hipotética XAP_pXAP410034 del plásmido pXap41	YP_004888070	9,93E-65	90% (94%)
traH	363	Proteína VirB6 translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pXap41	YP_004888071	2,15E-143	46% (64%)
traG	87	Probable proteína de exclusión de superficie del plásmido pXap41	YP_004888072	2,34E-41	67% (80%)
hp2	160	Proteína hipotética XAP_pXAP410037 del plásmido pXap41	YP_004888073	4,68E-92	77% (87%)
traF	272	Proteína VirB5 asociada al pilus del T4SS del plásmido pMOL98	AC197211	1,77E-123	78% (86%)
traD	534	Proteína acopladora, ATPasa del T4SS del plásmido pXap41	YP_004888075	0	89% (94%)
hp3	179	Proteína hipotética XAP_pXAP410040 del plásmido pXap41	YP_004888076	3,54E-50	66% (77%)
stbB	232	Proteína de herencia estable StbB del plásmido pIE321	YP_001911162	5,89E-85	52% (73%)
korA	136	Proteína reguladora transcripcional KorA del plásmido pSB102	NP_361025	1,27E-09	32% (61%)
mobC	118	Probable proteína accesoria del relaxosoma del plásmido pXap41	YP_004888079	5,32E-47	75% (83%)
nikB	792	Relaxasa NikB del plásmido pXap41	YP_004888080	0	76% (85%)
parA	210	Proteína de partición ParA del plásmido pDC3000A	NP_808674	1,63E-135	91% (96%)
ΔparB	73	Proteína de partición ParB, truncada, del plásmido pXap41	YP_004888082	2,00E-35	87% (96%)
hp4	157	Proteína hipotética XAP_pXAP410047 del plásmido pXap41	YP_004888083	3,36E-42	55% (64%)
ΔtraB	134	Probable proteína de la familia VirB4/TraB/CagE de ATPasas, del plásmido pSB102	NP_361082	6,09E-18	57% (70%)
merE	158	Proteína de resistencia a mercurio MerE, del elemento Tn21	AEV55348	7,71E-16	42% (52%)
merD	122	Proteína de regulación de la expresión secundaria MerD, del elemento Tn21	AAP88283	3,50E-56	74% (77%)
merA	562	Reductasa mercúrica MerA del elemento Tn21	AAP88282	0	99% (100%)
merC	141	Proteína transportadora de mercurio MerC, del elemento Tn21	AAP88281	6,24E-75	100% (100%)
merP	92	Proteína transportadora de mercurio MerP, del elemento Tn21	AAP88280	5,42E-46	100% (100%)
merT	117	Proteína transportadora de mercurio MerT, del elemento Tn21	YP_743751	5,48E-56	97% (98%)
merR	173	Represor transcripcional MerR del elemento Tn501	NP_085422	3,21E-111	93% (97%)
ata	100	Probable regulador transcripcional de la familia XRF, del plásmido pND6-1	NP_943125	1,60E-13	38% (67%)
pin	194	Invertasa-recombinasa Pin del plásmido pXap41	YP_004888084	4,69E-87	83% (88%)
staA	156	Proteína hipotética XAP_pXAP410049, probable antitoxina StaA, del plásmido pXap41	YP_004888085	6,58E-107	80% (87%)
staB	101	Probable toxina del plásmido pXap41	YP_004888087	3,49E-71	85% (91%)
hp5	124	Proteína hipotética XAP_pXAP410053 del plásmido pXap41	YP_004888088	1,66E-56	69% (80%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Sección 3

La filogenia de MOB_{P6} está encabezada por el plásmido R721, modelo del grupo de replicación IncI2 [282]. Otros 16 plásmidos forman el resto de la subfamilia, dividiéndose en tres grupos filogenéticos robustos, aunque insuficientemente resueltos (ver la figura 3.4.H.). La relaxasa de pBFp1, NikB, se agrupa de manera muy robusta (valores *bootstrap* mayores o iguales a 99) con aquellas de los plásmidos pES100 (NC_006842), pBPHY02 (NC_010627) y pXap41 (NC_016053). La mayor homología de NikB_pBFp1 la encontramos con la proteína NikB de pXap41 (76%; tabla 3.3.I.). Los módulos MOB y MPF se organizan alrededor del probable origen de transferencia, *oriT*, con *mobC* (que codifica para la proteína accesoria de la relaxasa) y *nikB* situados a 3' y *traD* (que codifica para la proteína acopladora) en dirección 5'. Aguas abajo de *traD*, encontramos los genes del módulo MPF incompleto: *traF* (proteína minoritaria del *pilus*, homólogo de VirB5 [283-286]), *traH* (parte del *core complex*, siendo una proteína de membrana interna, localizada en la luz del complejo [283, 285]) y el gen de exclusión de superficie *traG* (figura 3.4.G.).

La lista de los homólogos más próximos de TraF y TraH (no mostrada), indica que estas proteínas pertenecen a la subfamilia MPF_T de T4SS [73]. Como hemos dicho, el módulo MPF está incompleto, siendo improbable que el plásmido pueda transferirse sin el concurso de un plásmido conjugativo, característica que también compartiría con pXap41. La proteína TraH, homóloga de VirB6_pTi, es un componente específico de los T4SS tipo MPF_T [73], así que puede utilizarse para comparar las historias evolutivas de ambos módulos. En el panel B de la figura 3.4.H. se observa cómo los miembros de los clados P61 y P63, se encuentran dispersos por la topología del árbol, agrupándose entre sí o formando clados aislados del resto. La topología observada en el árbol de la relaxasa no se conserva en el de TraH. Esto sugiere que los módulos MOB y MPF tienen orígenes evolutivos distintos. Por otra parte, en ambos paneles se observa que pBFp1 y pXap41 aparecen agrupados robustamente, indicando su origen común.

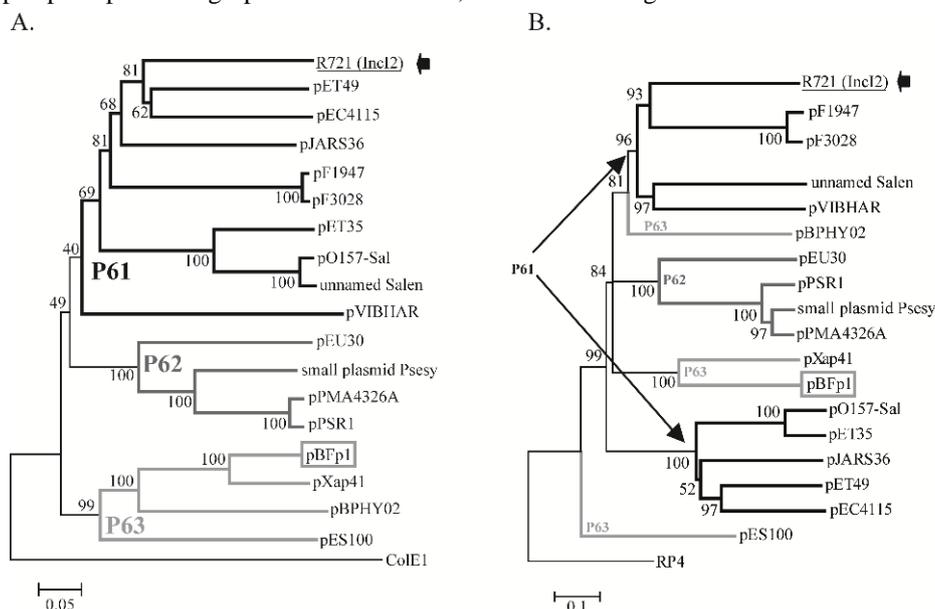


Figura 3.4.H. Filogenias de las proteínas relaxasa y VirB6/TraA de los plásmidos clasificados como MOB_{P6}. El panel A presenta la filogenia de las relaxasas MOBP6. Las proteínas incluidas en ella fueron obtenidas mediante el proceso ya explicado en la Sección 2. La filogenia fue reconstruida con los primeros 300 aminoácidos de cada una y siguiendo el método ya explicado en la misma sección. El panel B presenta la filogenia de la proteína TraH/TraA (homóloga de VirB6) de cada uno de los plásmidos anteriores. En este caso, se utilizó la proteína completa y dos métodos de reconstrucción para comprobar la robustez de la topología del árbol obtenido (*neighbour joining* y UPGMA; el segundo no mostrado). El plásmido R721, modelo del grupo IncI2 y del MOBP6, aparece subrayado e indicado por una flecha negra. El plásmido pBFp1 aparece recuadrado en gris claro. Las distintas divisiones que se pueden establecer en MOBP6 aparecen indicadas en los nodos correspondientes y en colores: P61, negro; P62, gris; P63, gris claro.

Entre el *oriT* y *traD* encontramos los genes *korA* (REG) y *stbB* (STB), homólogos de los homónimos de plásmidos MOB_{P42}/PromA y MOB_{F111}/IncW, respectivamente. La presencia de *stbB* sugiere un sistema STB incompleto. Sin embargo, se sabe que las proteínas StbA que existen guardan muy baja identidad de secuencia entre sí. Esto puede provocar que, en la búsqueda de homólogos más próximos realizada con BLASTp, no aparezcan miembros de esta superfamilia. Habría que acudir a análisis más profundos (homólogos lejanos, estructuras secundarias, etc.) para discernir ante qué tipo de proteína nos encontramos. Esto no es el objeto de este trabajo, por lo que catalogamos el gen en cuestión con la función de su homólogo más próximo.

El operón STB influye en la estabilidad y la tasa de conjugación del plásmido R388 [18, 287]. La eliminación de *stbA* incrementa la tasa de conjugación y reduce la estabilidad del plásmido, mientras que eliminar *stbB* reduce la frecuencia de conjugación sin alterar la estabilidad. KorA podría estar cumpliendo la función de StbA en pBFp1, dado que ambas proteínas podrían actuar como reguladores de la transcripción en los plásmidos del grupo IncW/MOBF11 [287].

También relacionado con la estabilidad del plásmido, pBFp1 contiene un sistema toxina/antitoxina de clase II, tipo RelE/StbE [288], compuesto por los genes *staA* y *staB*. Sus productos proteicos son homólogos de XAP_pXAP410049 y StaB, del plásmido pXap41 (tabla 3.4.G.). StaA tiene muy baja homología con el extremo carboxilo-terminal de antitoxinas tipo RelE/StbE, como por ejemplo, la de los plásmidos pPsv48C (CBZ40084) o pPMA4326C (YP_025712), ambos nativos de *Pseudomonas* sp. La estabilidad de pBFp1 en transmisión vertical queda garantizada por la acción de este sistema de adición molecular. La proteína estable (StaB) es tóxica para el metabolismo celular (dispara la muerte celular programada o el arresto del ciclo celular [55]). Su acción es contrarrestada por la unión de la antitoxina StaA, de vida media muy corta y ausente en las células que han perdido el plásmido.

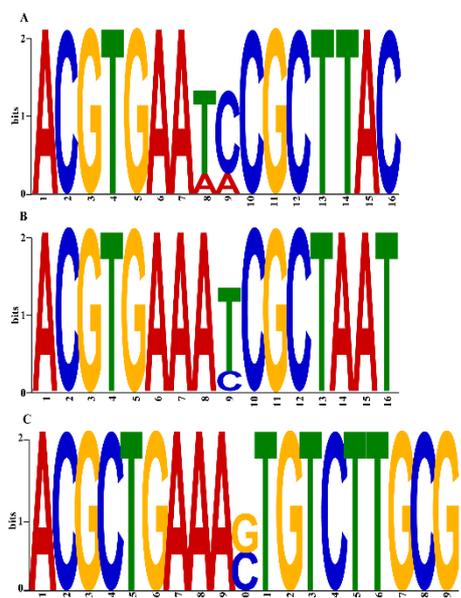


Figura 3.4.I. Logos del iterón consenso de los plásmidos A) pBFp1, B) R7K y C) pIPO2T. Obtenidos por medio de la *suite* informática online MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>). La altura de las bases coincide con la frecuencia de las mismas en cada posición considerada. Obsérvese la alta identidad de ambas secuencias consenso.

El plásmido pBFp1 posee también un sistema de partición activa de tipo I, incompleto (gen *parB* truncado y secuencia *parS* ausente), la antitoxina *ata* (sistema *tad/ata* del plásmido pAMI2 [289] y la resolvasa *pin* como otros sistemas potenciales para garantizar la estabilidad del plásmido (tabla 3.4.G. y figura 3.4.G.). Estos sistemas tienen su equivalente en el plásmido pXap41.

El módulo REP consta de dos genes (*repA* y *kfrA*) cuyos homólogos más próximos son de plásmidos MOB_{F111}/IncW (R7K) y MOB_{P4}/PromA (pIPO2T), respectivamente (tabla 3.4.G.). Situado entre los genes *repA* y *kfrA* está el origen de replicación. El *oriV* de pBFp1 consta de cinco repeticiones directas imperfectas, de 16 pb de longitud. La primera copia se encuentra alejada del resto unas 50 pb.

Sección 3

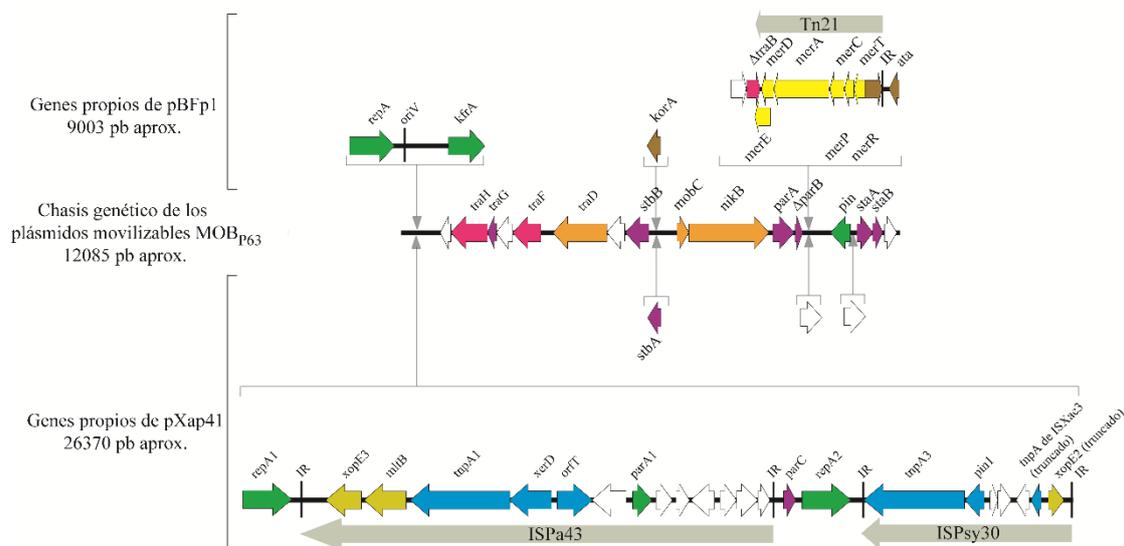


Figura 3.4.J. Chasis genético de los plásmidos movilizables MOB_{p63}. La codificación de las funciones de cada módulo es equivalente a la utilizada durante todo el trabajo. El chasis común comprende unas 12 kpb que contienen los módulos MOB, MPF y STB. El panel superior muestra los genes propios del plásmido pBFp1, de los módulos REP, REG y VAG. El panel inferior muestra los genes específicos del plásmido pXap41, de los módulos REP, STB y VAG. Estos últimos contienen genes que codifican efectores propios del T3SS [281]. Los sitios de inserción de cada uno de estos módulos se señalan mediante flechas en la secuencia general.

Las cuatro copias consecutivas se encuentran separadas por 2, 2 y 5 pares de bases, respectivamente (CT, CC y [A]₅). Previamente, se había descrito un iterón consenso propio de los plásmidos IncW y pBFp1 (ACGNN(N)AAA; [287]). Debido a ello y a las semejanzas entre las proteínas RepA de pBFp1, R7K (NC_010643) y pIPO2T (NC_003213) (30.9% y 31.3% respectivamente), se compararon las secuencias de los tres *loci oriV*. La figura 3.4.I. muestra que la secuencia descrita en [287] es un consenso válido para los tres grupos de replicación.

Por último, pBFp1 y pXap41 se distinguen por los genes que cargan sus módulos VAG y por el sitio de inserción de las mismas (figura 3.4.J.). pBFp1 carga con un transposón Tn21 que contiene un operón de resistencia a mercurio [132]. Este elemento móvil se inserta truncando el gen *traB*, del MPFT. Solo conserva una de las secuencias flanqueantes IR. En la tabla 3.4.G. se puede apreciar que los homólogos de los genes *merA*, *merC*, *merP* y *merR* tienen porcentajes de identidad con aquel elemento móvil entre el 90% y el 100%. Por otra parte, los genes *merD* y *merE*, que se encuentran casi completamente solapados, resultan muy divergentes respecto de los genes en las bases de datos (74% y 42% de identidad respectivamente), lo que resulta chocante comparado con la conservación observada en los otros elementos del operón *mer*.

Por otra parte, el plásmido pXap41 presenta dos secuencias de inserción, ISPa43 e ISPsy30 (de la familia Tn3) ambas aguas abajo de cada replicación del plásmido. Ambos IS cargan con toxinas exportables a través de un T3SS, que convierten en patógeno a su huésped [281]. La figura 3.4.J. muestra también cómo la arquitectura de los plásmidos pBFp1 y pXap41 se conserva, con las salvedades mencionadas.

3.5. Aislados con relaxasas MOB_{F11}

Entre las distintas colecciones de aislados se detectaron 19 relaxasas cuyas secuencias eran nuevas cuando se secuenciaron [114]. Actualmente, todas tienen descrito en las bases de datos un homólogo más próximo con homología del 100% de su secuencia de aminoácidos. Como quedó patente en la Sección 1, el principal motivo de este trabajo es utilizar DPMT como una herramienta exploratoria en la detección de variabilidad inaccesible por PBRT. Del mismo modo, hemos hecho siempre hincapié en nuestro interés

Sección 3

tradicional por los pequeños plásmidos conjugativos de la subfamilia MOB_{F11}. Por ello, escogimos 8 aislados con relaxasas MOB_{F112} nuevas para llevar a cabo un estudio más profundo de sus relaxasas y los plásmidos en los que están contenidas. A esta lista, añadimos dos aislados con relaxasas MOB_{F112} iguales a la del plásmido modelo del grupo de replicación IncN1, R46, para compararlas con ésta y con las de los plásmidos nuevos (tabla 3.5.A.).

Se aislaron por conjugación los plásmidos MOB_{F11} de las diez cepas anteriores (Sección 2). Todos los donadores produjeron transconjugantes, incluyendo TC1#79, que no los producía en el laboratorio de la Dra. Teresa Coque. Para éste, llevamos a cabo la conjugación en medio líquido. Los transconjugantes seleccionados amplificaron únicamente con la pareja de sondas F11-f+F11-r, excepto A14179, caso en el que no se pudo obtener el plásmido MOB_{F11} aislado del resto. Determinamos el perfil de AbR de los donantes y de las once cepas transconjugantes obtenidas, (tabla 3.5.A.). Amplificamos y secuenciamos el motivo relaxasa de cada uno de los plásmidos MOB_{F11} aislados en cada transconjugante. El procedimiento es similar al explicado en el apartado *Construcción de una genoteca por amplificación*, sección 2.2., salvo porque empleamos cebadores consenso diseñados para los motivos relaxasa de los plásmidos IncN1/MOB_{F112}.

Las relaxasas secuenciadas se agrupan en tres clusters (figura 3.5.A.). El primer grupo, formado por las de los plásmidos pA14159, pA15229a y pA16089a (en la figura 3.5.A., los dos primeros están colapsados dentro del cluster IncN1) son idénticas a las de los plásmidos IncN1 (entre un 98% y un 100% de identidad; tabla 3.5.B.). Los plásmidos pA14159 y pA15229a son IncN1, mientras que pA16089a no pudo ser clasificado por PBRT. El segundo cluster lo forman las relaxasas de los plásmidos pA16042a, pA16025a, pA16033 y pA14179a (figura 3.5.A.). Éstas son idénticas a la del plásmido modelo IncN2 p271A [153] (entre un 94.3% y un 100% de identidad en secuencia de aminoácidos; tabla 3.5.B.). El tercer cluster de relaxasas se compone de cuatro moléculas, idénticas a la del plásmido IncN3 pN-Cit, plásmido nativo de *Citrobacter freundii* [235]. Ninguno de los cuatro plásmidos que las contienen pudo ser clasificado por PBRT.

Tabla 3.5.A. Aislados F11⁺ y sus correspondientes transconjugantes.

Colección ^a	Aislado			Plásmidos		Antibiograma	
	Donante ^b	Transconjugante ^c	Tamaño ^d	Replicón ^e	Relaxasa ^f	Donante ^g	Transconjugante ^h
Ramón y Cajal	TC1#30	A14130	80+27	I1	F11+P12+P51	Ap; Nx; Rif	Sm ³⁰⁰ ; Ap
Ramón y Cajal	TC1#59	A14159	40	N	F11*	Ap; Sm ³⁰⁰ ; Rif; Km; Tp	Rif; Ap; Tp
Ramón y Cajal	TC1#69	A14169	27	-	F11+P51	Ap; Nx; Rif	Sm ³⁰⁰ ; Ap
Ramón y Cajal	TC1#79	A14179	258+228+152+113	-	F11+F12+H12+P51	Ap; Sul	Rif; Ap; Sul
Ramón y Cajal	TC2#29	A15229	-	FII+N	F11*+F12	Ap; Tp; Nx; Sm ¹⁰ ; Sul	Rif; Ap; Tp; Sul
Sant Pau	SP#25	A16025	64	-	F11+P11	Ap; Sm ³⁰⁰ ; Rif; Km; Sul	Nx; Ap; Sul
Sant Pau	SP#33	A16033	-	-	F11	Ap	Nx; Ap
Sant Pau	SP#42	A16042	75	-	F11+P11	Ap; Sm ³⁰⁰ ; Km; Sul; Rif	Nx; Ap; Sul
Sant Pau	SP#89	A16089	93	F _{repB} +II+K+Y	F11+F12+P11+P12	Ap; Sm ³⁰⁰ ; Km; Rif	Nx; Ap
Autónoma	UAB#5	A17005	45	-	F11+P11+P51	Ap; Sm ³⁰⁰ ; Rif; Sul	Nx; Ap
Valdecilla	V3#37	A18337	170+100+6+5	FIB+F _{repB} +H1+CoIE	F11+F12+P12+Qu+P51	Ap; Tc; Sm ¹⁰ ; Nx; Sul	Rif; Ap; Sm ¹⁰ ; Tc; Sul

a. Colección original de cada aislado. Referido a la sección 3.2.

b. Nombre de cada cepa donadora. Referido a la sección 3.2.

c. Nombre del transconjugante obtenido.

d. Tamaño del plásmido en cada cepa donadora (en kb), indicado por el laboratorio de origen en todos los casos.

e. Tipo de replicón detectado en las cepas donadoras por el laboratorio de origen. Un guión (-) indica que no se detectó ningún replicón. Para un detalle sobre los métodos utilizados en cada caso, ver la Sección 3.2.

f. Tipo de relaxasa detectada en el análisis descrito en la Sección 3.2. Un asterisco (*) indica los aislados con relaxasas F11 idénticas a las del plásmido IncN1 R46.

g. Perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas donadoras.

h. Perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas transconjugantes. Tanto en donadoras como en transconjugantes, las claves para los antibióticos son: Hg, mercurio; Rif, rifampicina; Nx, ácido nalidíxico; Sm³⁰⁰, estreptomina, 300µg/mL; Ap, ampicilina; Km, kanamicina; Tp, trimetoprim; Tc, tetraciclina; Cm, cloranfenicol.

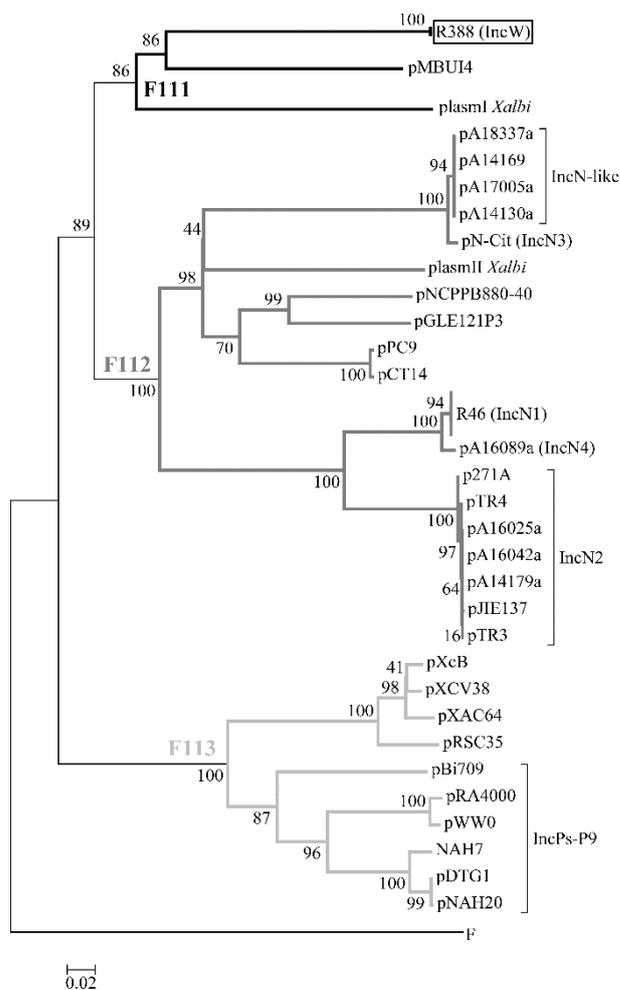


Figura 3.5.A. Filogenia de la subfamilia MOB_{F11} actualizada. La filogenia fue reconstruida de acuerdo a lo expuesto en la Sección 2, utilizando solo las relaxasas MOB_{F11} obtenidas en la iteración de convergencia. La filogenia está actualizada a fecha de Julio de 2013. La relaxasa TrwC de R388, modelo de la familia MOB_{F11}, aparece recuadrada. La nomenclatura de las ramas de la filogenia representa grupos de relaxasas sostenidos por valores de nodos estadísticamente significativos (esto es, >95) y es acorde con lo publicado anteriormente en [1-4]. Las ramas más importantes se muestran en colores distintos: F111 (negro), F112 (gris) y F113 (gris claro). Los grupos de incompatibilidad se indican en función de los datos bibliográficos o proporcionados empíricos (en el caso de las relaxasas nuevas incorporadas a la filogenia). pMBUI4 no está disponible en las bases de datos y se incorpora en esta filogenia por la amabilidad de la Dra. Eva Top. *Xalbi* se refiere a *Xanthomonas albilineans*, huésped de los plásmidos plasmI y plasmII.

En la figura 3.5.B. se muestra la filogenia de las RepA de los plásmidos anteriores junto a las de los demás plásmidos del complejo N. Los plásmidos pA15229a y pA14159a se clasificaron como IncN1 por PBRT y sus RepA pertenecen a la superfamilia Rep₃, igual que las de los demás plásmidos IncN1.

Por otra parte, los plásmidos pA14130a, pA14169, pA17005a y pA18337a tienen RepA de tipo Rep₃, pero formando un cluster separado del IncN1, (figura 3.5.B.). El plásmido pGOC049 es su modelo en cuanto a su RepA, pero se desconoce la secuencia de su relaxasa, al no estar secuenciado por completo [290]. En la figura 3.5.B. se sugiere incluir a pA14130a, pA14169, pA17005a y pA18337a en el grupo IncN-like, representado por pGOC049.

Los plásmidos pA14179a, pA16025a y pA16042a tienen RepA de la superfamilia RepA_C, igual que los plásmidos p271A, pJIE137 y otros como ellos (figura 3.5.B.). p271A y pJIE137 forman un grupo de incompatibilidad denominado IncN2, aunque esta definición está basada en semejanzas de secuencia y arquitectura comunes [153].

El último de los plásmidos F11 señalado en la figura 3.5.B., pA16089a, también tiene una RepA de tipo RepA_C, pero aparece aislado de todos los grupos anteriores. Su homóloga más próxima es RepA_{pN-Cit}, plásmido modelo del grupo

IncN3 [235]. Igual que IncN2, el subgrupo IncN3 se define por la arquitectura del plásmido modelo, similar a la de R46 y otros plásmidos IncN1, así como por las semejanzas entre sus secuencias. En el caso de pA16089a, la posición de su RepA (así como la de su relaxasa; figura 3.5.A.), sugiere que se trata del primer miembro de un nuevo grupo del complejo N, que denominaremos IncN4.

Sección 3

Tabla 3.5.B. Homólogos más próximos de las nuevas relaxasas MOB_{F11}.

Transconjugante ^a	Acceso ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (cobertura) ^e
A14130	JQ429312	Relaxasa TraI del plásmido pCT14	YP_001966297	5,00E-137	69% (79%)
A14159	JQ429313	Relaxasa TraI hipotética del plásmido pLEW517	YP_001096334	0.0	100% (100%)
A14169	-	Relaxasa TraI del plásmido pCT14	YP_001966297	1,00E-143	68% (79%)
A14179	JQ429314	Relaxasa TraI del plásmido p271A	YP_004765041	0.0	100% (100%)
A15229	JQ429315	Relaxasa TraI del plásmido 9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286896	4,00E-174	100% (100%)
A16025	-	Relaxasa TraI del plásmido p271A	YP_004765041	0.0	100% (100%)
A16033	JQ429316	Relaxasa TraI del plásmido p271A	YP_004765041	0.0	100% (100%)
A16042	AEA76430	Relaxasa TraI del plásmido p271A	YP_004765041	0.0	94% (96%)
A16089	JQ429317	Relaxasa TraI del plásmido pKP96	YP_002332893	4,00E-165	98% (99%)
A17005	JQ429318	Relaxasa TraI del plásmido pCT14	YP_001966297	4,00E-132	68% (79%)
A18337	JQ429319	Relaxasa TraI del plásmido pCT14	YP_001966297	6,00E-133	68% (79%)

- a. Nombre de la cepa transconjugante que contiene el plásmido MOB_{F11} amplificado.
- b. Número de acceso de cada relaxasa en la base de datos del NCBI. Un guión indica que aún no se dispone de dicho número.
- c. Proteína homóloga más próxima.
- d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa

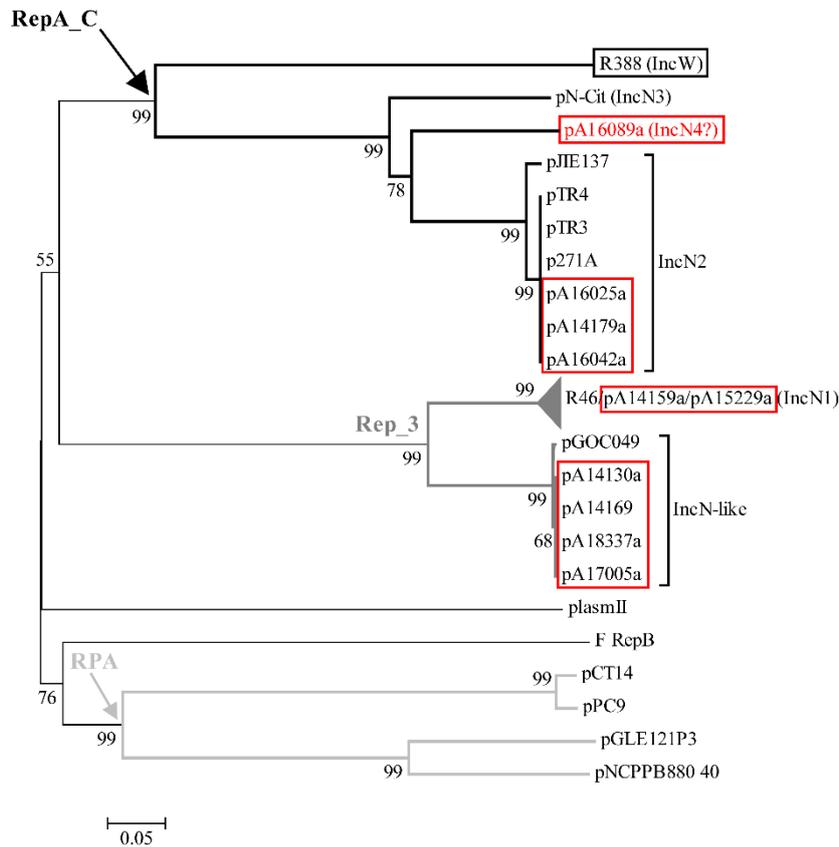


Figura 3.5.B. Filogenia de las proteínas iniciadoras de la replicación de los plásmidos MOB_{F11}/IncN secuenciados. Las proteínas iniciadoras de la replicación completas fueron alineadas utilizando AlignX y la filogenia se construyó mediante el programa Mega, tal como se ha explicado en la Sección 2. En las ramas de la misma está indicada la superfamilia Rep a la que pertenece cada una de las unidades taxonómicas representadas. Al final de las ramas, se indica el grupo de incompatibilidad de cada plásmido. El grupo IncN1 se encuentra comprimido por claridad La RepA del plásmido R388, modelo de la familia MOB_{F11} de relaxasas, aparece indicada por un recuadro gris claro. Las RepA de los plásmidos MOB_{F11} secuenciados y descritos en este apartado, aparecen indicados con un recuadro rojo. El plásmido pA16089a aparece con letras rojas para indicar que el grupo IncN4 es una suposición.

Secuencia y rasgos generales de los plásmidos IncN2.

Los plásmidos IncN2 secuenciados completamente son pA16025a (figura 3.5.C.) y pA16042a (no mostrado), mientras que pA14179a se presenta incompleto (figura 3.5.G.) y de pA16033 no se pudo obtener información. El análisis de las secuencias obtenidas y su comparación con las de los plásmidos IncN2, indica que este grupo está formado por una serie de genes fundamentales comunes, involucrados en la replicación, estabilidad, establecimiento y transferencia horizontal. Además, de acuerdo con lo observado, los dos plásmidos cargan con un elemento accesorio complejo, idéntico, que será descrito con detalle más adelante.

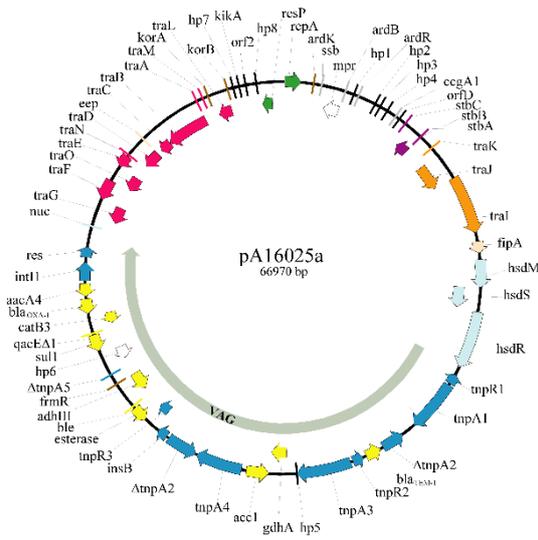


Figura 3.5.C. Mapa genético del plásmido IncN2 pA16025a. La leyenda de la figura es igual que la correspondiente de la figura 3.4.A. La organización del módulo VAG se detalla en la figura 3.5.D.

El plásmido pA16025a (figura 3.5.C. y tabla 3.5.C.) se compone de de 66970 pb, que contienen 70 ORFs identificados con genes de las bases de datos. Estos 70 genes están codificados en un total de 56970 pb (85% de ocupación del genoma). 62 genes tienen un homólogo cuya función es conocida o ha sido deducida por homología. 31 de los 70 genes (31941 pb) pertenecen al módulo VAG, incluyendo 11 genes de resistencia a antibióticos, mientras que los otros 39 pertenecerían a los demás módulos funcionales (tabla 3.5.C.).

Sus proteínas serían en todos los casos 100% idénticas a las del plásmido p271A, de modo que, en la tabla 3.4.C. indicamos la identidad al segundo *hit* en lugar del primero. Únicamente los genes del módulo variable no son 100% idénticos a los del plásmido p271A, siendo recogido en la mencionada tabla el primer *hit* de cada BLAST realizado. VAG consiste en siete elementos móviles imbricados (figura 3.5.D.): aguas abajo del módulo MOD encontramos un elemento semejante a Tn5403, delimitado por sus dos IR respectivas y que tiene transposasa y resolvasa. Carece de repeticiones directas (DR) flanqueándolo, lo que indica que su transposición no es reciente. El siguiente elemento que encontramos aguas abajo es Tn6901, que carece de IR o DR reconocibles. Aparte de su carga de genes de resistencia, Tn6901 ha sufrido la transposición de dos elementos móviles en su secuencia. El primero es un Tn3 (figura 3.5.D.) que carga con el gen *bla*_{TEM.1} y con el elemento Δ ISEc1, previamente descrito [114]. Tn3 se encuentra interrumpiendo la transposasa de Tn6901 y conserva tanto las IR como las DR, lo que indica que el evento de inserción ha sido reciente.

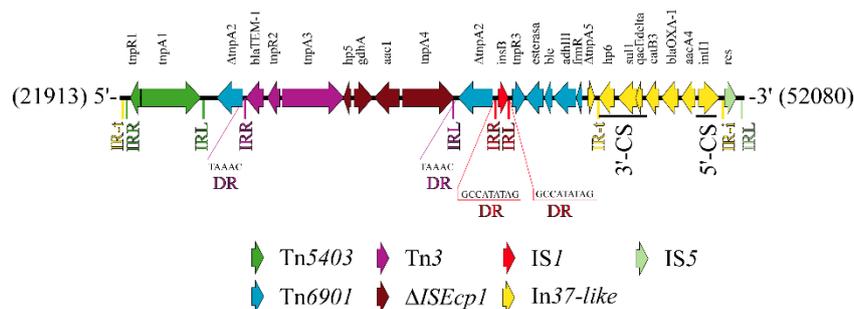


Figura 3.5.D. Representación simplificada del módulo VAG en pA16025a. Cada color representa uno de los elementos móviles encontrados en este plásmido, así como las secuencias que los delimitan (IR para las repeticiones invertidas y DR para las duplicaciones repetidas, producidas por la transposición). Las flechas indican la dirección de transposición. En los extremos de la figura se indica el sentido general de la secuencia, junto con las coordenadas de comienzo y final de la misma en pA16025a

Sección 3

El segundo elemento insertado en Tn6901 es una secuencia de inserción tipo IS1, que conserva IR y DR. Esto indica que es de reciente incorporación. El sexto elemento encontrado es un integrón de clase 1, de clase In4, aunque carece de la secuencia IS6100/Δ, propio de estos elementos [291]. Conserva las distintas secuencias IR del elemento, es decir, una copia de IR-i y dos de IR-t. Es interesante mencionar que la segunda IR-t se encuentra aguas arriba del elemento Tn5403 previamente descrito, lo que sugiere que toda la estructura de VAG (i.e. n5403, Tn6901-Tn3-ΔISEcp1-IS1) se encuentra integrada en el lugar de la secuencia IS6100/Δ (figura 3.5.D.).

Tabla 3.5.C. Genes encontrados en el plásmido pA16025a (continúa).

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
repA	294	Proteína RepA de la isla de patogenicidad pKLC102	AAP22621	2,00E-153	71% (82%)
ardK	111	Proteína ArdK del plásmido R46	NP_511219	5,00E-40	59% (75%)
ssb	176	Proteína Ssb del plásmido EaACW_pEI70	AEX08407	4,00E-56	87% (95%)
mpr	301	Probable proteína Mpr del plásmido pIP1202	YP_001102123	1,00E-156	82% (91%)
ardB	140	Proteína de antirrestricción ArdB del plásmido pEC_L46	YP_003829320	4,00E-44	49% (66%)
hp1	87	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AFY80252	2,00E-58	95% (95%)
ardR	183	Proteína putativa ArdR del plásmido pLEW517	YP_001096391	1,00E-26	43% (58%)
hp2	108	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AEY80250	1,00E-33	93% (98%)
hp3	74	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AFY80249	7,00E-51	99% (75%)
hp4	68	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AEY80240	2,00E-45	93% (97%)
csgA1	60	Proteína CsgA1 del plásmido R46	NP_511209	2,00E-29	78% (83%)
orfD	123	Probable proteína OrfD del plásmido p9	YP_002286890	2,00E-42	68% (100%)
stbC	122	Proteína StbC del plásmido p9	YP_002286891	2,00E-24	42% (100%)
stbB	238	Probable proteína StbB del plásmido pSG1	YP_257060	9,00E-146	80% (100%)
stbA	143	Proteína StbA del plásmido pNL194	YP_003813080	2,00E-53	57% (100%)
traK	158	Proteína accesoria del relaxosoma del plásmido R46	NP_511203	1,00E-57	59% (100%)
traJ	530	Proteína acopladora, ATPasa del plásmido pNL194	YP_003813078	0.0	64% (100%)
traI	1065	Relaxasa del plásmido pKC396	ADH30046	0.0	67% (100%)
fip	221	Proteína Fip del plásmido 4 de <i>Aeromonas salmonicida</i>	YP_001144118	2,00E-129	81% (100%)
hsdM	518	Sistema de modificación/restricción, ADN metiltransferasa, subunidad M del plásmido pN3	YP_004558230	0.0	97% (99%)
hsdS	415	Sistema de modificación/restricción, ADN metiltransferasa, subunidad S del plásmido pN3	YP_001816643	6,00E-76	39% (100%)
hsdR	1038	Sistema de modificación/restricción, ADN metiltransferasa, subunidad R del plásmido pN3	YP_001816644	0.0	78% (100%)
tnpR1	166	Proteína resolvasa del plásmido pC15-1a, Tn5403	NP_957549	1,00E-119	100% (100%)
tnpA1	965	Proteína transposasa del plásmido pC15-1a, Tn5403	NP_957548	0.0	100% (100%)
ΔtnpA2	426	Proteína transposasa del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639975	0.0	100% (43%)
bla _{TEM}	286	Beta-lactamasa del plásmido pJD4, Tn3	NP_052173	0.0	100% (100%)
tnpR2	162	Proteína resolvasa del plásmido pC15-1a, Tn3	NP_957564	6,00E-113	99% (100%)
tnpA3	1002	Proteína transposasa del plásmido pZA1001, Tn3	YP_003226978	0.0	100% (100%)
hp5	126	Proteína hipotética del plásmido pKF3-94, Tn3	YP_003517530	3,00E-77	94% (89%)
gdhA	304	Proteína GdhA del plásmido p3521, ΔISEcp1	YP_004119739	0.0	100% (100%)
accI	408	Proteína AccI de un plásmido de <i>Kelbsiella pneumoniae</i> , ΔISEcp1	ABQ42698	0.0	100% (95%)
tnpA4	850	Proteína transposasa del plásmido pCTX-M3, ΔISEcp1	NP_775058	0.0	99% (99%)
ΔtnpA2	567	Proteína transposasa del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639975	0.0	99% (57%)
insB	167	Proteína transposasa del plásmido pOI.A52, IS1	YP_001693183	8,00E-127	99% (100%)
tnpR3	211	Proteína resolvasa del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639974	2,00E-159	99% (100%)
esterasa	283	Esterasa del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639973	0.0	100% (100%)
ble	132	Probable glyoxalasa del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639972	5,00E-94	99% (100%)
adhIII	369	Proteína AdhIII del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639971	0.0	100% (100%)
frmR	91	Proteína FrmR del plásmido Rts1, Tn6901	NP_639970	9,00E-66	100% (100%)
ΔtnpA5	68	Proteína transposasa del plásmido pECTm80, Tn3, In4	YP_004422905	3,00E-46	99% (100%)
hp6	241	Proteína hipotética del plásmido pAPEC-O1-R, In4	YP_001481449	9,00E-170	99% (100%)
sul1	308	Proteína de resistencia a sulfonamidas del plásmido pIP1206, In4	YP_001816598	0.0	99% (100%)
qacEΔ1	115	Proteína de multiresistencia del plásmido R100, In4	NP_052896	1,00E-77	100% (100%)
catB3	210	Proteína CatB3 del plásmido pAPEC-O2-R, In4	YP_190213	2,00E-161	100% (100%)
bla _{OXA}	276	Proteína Oxa-1 del plásmido pC15-1a, In4	NP_957554	0.0	100% (100%)
aacA4	230	Proteína AacA4 del plásmido pEK516, In4	YP_003108195	5,00E-164	100% (93%)
intI1	337	Integrasa del plásmido R100, In4	NP_052898	0.0	100% (100%)
res	191	Proteína que contiene un dominio resolvasa, del plásmido pDEIPR04, IS5	YP_004257069	1,00E-86	67% (96%)
nuc	121	Endonucleasa del plásmido pP99-018	YP_908597	3,00E-67	74% (100%)
traG	333	Proteína VirB11, ATPasa del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829304	3,00E-165	64% (99%)
traF	377	Proteína VirB10 del core complex del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829303	5,00E-149	58% (100%)
traO	295	Proteína VirB9, del core complex del T4SS del plásmido pP99-018	YP_908594	5,00E-164	69% (100%)
traE	234	Proteína VirB8, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido p9	YP_002286905	7,00E-134	76% (100%)
traN	43	Proteína VirB7, del core complex del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829300	2,00E-23	77% (100%)
traD	345	Proteína VirB6, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido p12	YP_002286993	3,00E-109	51% (100%)
cep	80	Proteína de exclusión de entrada del plásmido pMUR050	YP_724495	6,00E-23	51% (88%)
traC	237	Proteína VirB5, minoritaria del p11us del T4SS del plásmido p9	YP_002286909	3,00E-110	67% (99%)
traB	857	Proteína VirB4, ATPasa del T4SS del plásmido pKP96	YP_002332880	0.0	69% (99%)
traA	105	Proteína VirB3, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pLEW517	YP_001096371	5,00E-55	70% (100%)

Tabla 3.5.C. (Continuación)

traM	118	Proteína VirB2, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido R46	NP_511188	1,00E-35	55% (83%)
korA	92	Proteína KorA del plásmido R46	NP_511187	8,00E-46	67% (98%)
traL	260	Proteína VirB1, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829292	3,00E-101	66% (100%)
korB	105	Probable proteína KorB del plásmido pLEW517	YP_001096375	7,00E-45	62% (96%)
hp7	116	Proteína hipotética del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286917	8,00E-12	33% (100%)
kikA	118	Proteína hipotética del plásmido pJARS3618	YP_004221705	2,00E-28	45% (90%)
orf2	102	Proteína Orf2 del plásmido R46	NP_511182	1,00E-37	54% (100%)
hp8	66	Proteína hipotética del plásmido pCD630	YP_659585	1,00E-10	47% (71%)
resP	202	Resolvasa ResP del plásmido pHS8	ABU86822	3,00E-99	67% (100%)

- Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.
- Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.
- En esta tabla se proporciona la segunda proteína más próxima en la lista de resultados obtenidos por BLAST, dadas las razones expuestas en el texto. La única excepción se hace con los genes del módulo VAG.
- Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.
- Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Por último, aguas abajo de este integrón, encontramos la resolvasa de un elemento IS5, así como la IRL del mismo. Tanto el gen de la resolvasa, como la secuencia de la IRL conservada, divergen aproximadamente un 40% de su homólogo más próximo (tabla 3.5.C.). Esto sugiere que éste fue el primer elemento en formar el VAG, sobre el que se insertaron, secuencialmente, *In4*, sobre él, *Tn5403* y *Tn6901*. Posteriormente, sobre *Tn6901* se insertaron, *Tn3*, Δ *ISEcp1* y *IS1*.

Por los porcentajes de identidad observados, entendemos que todos estos genes, excepto la resolvasa de IS5, son de reciente adquisición por transferencia genética horizontal entre los distintos plásmidos que poseen estos elementos aislados. Una búsqueda de la secuencia de nucleótidos de la región VAG de pA16025a con BLASTn indicó que no existe un elemento igual a éste en la base de datos (es decir, con una identidad del 100% y una cobertura también del 100%). La presencia en pA16025a de toda esta carga genética hace que este plásmido sea multirresistente.

El resto de las proteínas codificadas en pA16025a son idénticas a las de los plásmidos IncN2 [153, 168, 252] (tabla 3.5.C.). Los módulos MOB y MPF se encuentran separados por la inserción del módulo VAG, al igual que ocurre en muchos plásmidos del complejo N. MOB y MPF constan de 17 genes, de los que tres no codifican ningún tipo de maquinaria de procesamiento conjugativo del ADN. De estos tres, uno forma parte de MOD al ser una endonucleasa (*nuc*) y los otros dos se relacionan con la conjugación al afectar la fertilidad de ciertos plásmidos (*filp*) o al producir exclusión de superficie (*eep*). Los módulos MPF y MOB completos, así como la obtención de transconjugantes del plásmido pA16025a, permiten afirmar que se trata de un plásmido conjugativo.

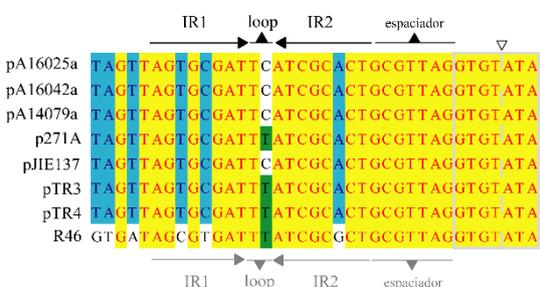


Figura 3.5.E. Alineamiento de los probables puntos de corte del *oriT* y las secuencias asociadas a una posible estructura secundaria. Se comparan las secuencias de los plásmidos IncN2 mencionados en el texto con la del modelo IncN1, R46. Los componentes del *oriT* de los plásmidos IncN2 están señalados en negro, mientras que los de R46 lo están en gris. El recuadro gris claro señala la secuencia conservada que contiene el probable sitio de corte. Éste está señalado por una cabeza de flecha blanca y una línea de puntos gris.

En dirección aguas arriba del gen *traK* se localiza el probable *oriT* del plásmido pA16025a. La probable horquilla de reconocimiento del mismo constaría de 36 pb, distribuidas en dos repeticiones invertidas de 8 pb cada una, una secuencia *loop* entre ambas de 2 pb, un espaciador de 7 pb y la secuencia de corte de 7 pb, idéntica a la del *oriT* de R46 (GTGT^ATA) (figura 3.5.E.). El módulo REP incluye dos genes (resolvasa, proteína iniciadora de la replicación). *repA* codifica la proteína iniciadora de la replicación, homóloga a la de la isla de patogenicidad (PAI) pKLC102 (como ocurre en p271A y pJIE137). En dirección 3' a *repA* de los

Sección 3

tres plásmidos, se encuentra el probable *oriV*, compuesto por cinco copias imperfectas, adyacentes, de una secuencia de 19 pb (figura 3.5.F.).

El replicón de pKLC102 consta de cuatro repeticiones imperfectas, de 19 pb, contiguas, excepto la primera de ellas, que se localiza inmediatamente tras el final del gen *repA*, a 122 pb del segundo iterón. Las secuencias consenso de ambos grupos de iterones muestran una secuencia de entre 6 y 8 citosinas contiguas conservadas (respectivamente), en posición 3' de cada copia. La parte 5' del iterón, por el contrario, es más variable, encontrándose conservadas las bases CGTNANAT.

El módulo STB del plásmido pA16025a consta de 3 genes, *stbABC*, aguas arriba del probable *oriT* del plásmido. El módulo EST se compone de al menos 4 genes de función conocida, *ssb*, *ardB*, *ardR* y *ccgAI*, encargados de facilitar la supervivencia de la cadena de ADNcs en la célula receptora,

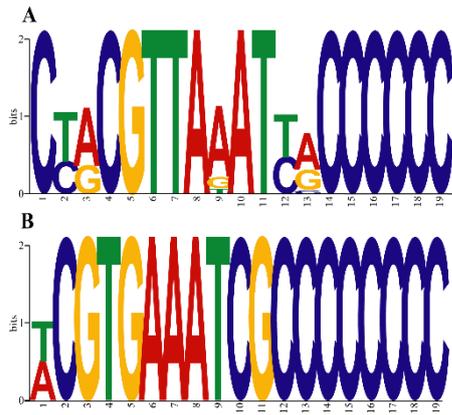


Figura 3.5.F. Logo del iterón consenso de los plásmidos MOB_{F112}/IncN2. Se predijeron, como ya se ha descrito, las secuencias y el número de iterones de los replicones de los plásmidos MOB_{F112}/IncN2 detallados en el texto. Presentamos la secuencia consenso de los mismos (panel A). Comparamos la secuencia de este iterón consenso con la del PAI MOB_{H2} pKLC102 (panel B). Las alturas de cada base responden a su frecuencia.

así como de evitar la acción de los sistemas de restricción nativos. Se encuentran próximos al módulo REP, al igual que parte del módulo REG (consistente en el gen *ardK* y *ardR*). Los otros dos miembros de REG, *korA* y *korB*, se encuentran en dirección 5' del inicio del módulo MPF. En conjunto, los productos de todos estos genes tienen como segundos homólogos, proteínas de plásmidos MOB_{F112}/IncN1, con notables excepciones, como Mpr, que es más parecida a su homónima del plásmido pIP1202 (MOB_{H121}/IncA/C; tabla 3.5.C.).

Del aislado A14179 obtuvimos la secuencia de una relaxasa IncN2 y, al igual que con pA16025a, procedimos a la secuenciación del posible plásmido F112/IncN2. Como se ve en la tabla 3.5.A., el aislado A14179 carga con al menos cuatro plásmidos de grandes dimensiones.

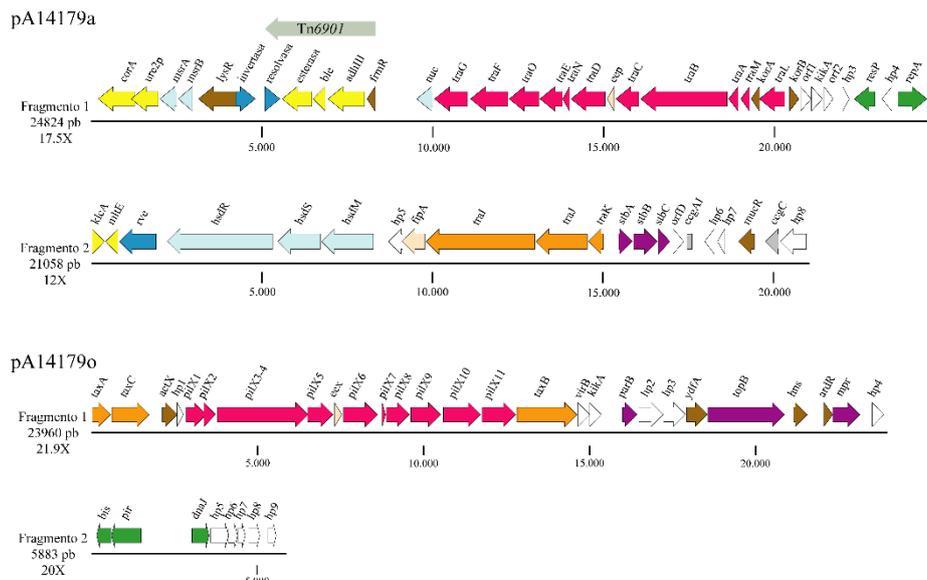


Figura 3.5.G. Mapa genético de los plásmidos contenidos en el aislado A14179. Las secuencias de los dos plásmidos están incompletas. Las secuencias bajo el epígrafe pA14179a corresponden al plásmido MOB_{F112}/IncN2 semejante a pA16025a (figura 3.4.B.) y aquellas bajo el epígrafe pA14179o corresponden al plásmido MOB_{P31}/IncX6. De nuevo, el resto de la leyenda se corresponde con la descrita en la figura 3.4.A.

Sección 3

Tabla 3.5.D. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA14179a.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
<i>corA</i>	370	Probable transportador de iones metálicos del plásmido pFBBAOT6	YP_067873	0	100% (87%)
<i>ure2p</i>	277	Glutación-S-transferasa del plásmido pFBAOT6	YP_067874	2,59E-170	100% (84%)
<i>msrA</i>	179	Metionina sulfoxido reductasa MsrA, del plásmido pFBAOT6	YP_067875	3,31E-127	100% (100%)
<i>msrB</i>	152	Metionina sulfoxido reductasa MsrB, del plásmido pFBAOT6	YP_067876	2,75E-109	99% (100%)
<i>lysR</i>	394	Regulador transcripcional de la familia LysR, plásmido pFBAOT6	YP_067877	0	97% (66%)
<i>invertasa</i>	205	Invertasa/resolvasa del plásmido AZOBR_p3	YP_004986358	1,79E-66	69% (82%)
<i>resolvasa</i>	161	Probable resolvasa del plásmido pBK31551	YP_007195414	2,03E-115	100% (100%)
<i>esterasa</i>	302	S-formilglutacion hidrolasa del plásmido pBK31551	YP_007195415	0	100% (100%)
<i>ble</i>	133	Proteína de resistencia glyoxalasa/bleomicina del plásmido pBK31551	YP_007195416	2,05E-90	100% (100%)
<i>adhIII</i>	370	Alcohol deshidrogenasa del plásmido Rts1	NP_639971	0	100% (100%)
<i>frmR</i>	92	Represor transcripcional del plásmido R830b	YP_006964644	2,68E-64	100% (100%)
<i>klcA</i>	126	Proteína hipotética del plásmido pKPosa-48N2	YP_008110894	2,24E-75	83% (92%)
<i>mltE</i>	130	Transglicosilasa del plásmido pKRH	CC169682	5,96E-73	85% (90%)
<i>rve</i>	371	Integrasa del plásmido pUMNF18_IncFV	AEJ60072	0	98% (98%)
<i>hp6</i>	106	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AEY80240	3,64E-42	93% (64%)
<i>hp7</i>	87	Proteína hipotética del plásmido p1R3	YP_006959350	5,50E-20	87% (87%)
<i>mucR</i>	166	Probable regulador transcripcional MucR, del plásmido pJIE137	AEY80243	8,84E-117	98% (99%)
<i>cggC</i>	138	Proteína CggC del plásmido pJIE137	AEY80245	3,14E-42	97% (64%)
<i>hp8</i>	264	Proteína hipotética del plásmido pJIE137	AEY80246	3,98E-147	83% (90%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

En el transconjugante encontramos secuencias de al menos dos plásmidos, uno del grupo MOB_{F112}/IncN2 (pA14179a; figura 3.5.G.) y otro del MOB_{P31} y cuya proteína iniciadora de la replicación guarda un 66% de identidad con su homóloga más próxima (pA14179o; figura 3.5.G. y tabla 3.5.E.). En esencia, lo dicho para el plásmido pA16025a es válido también para pA14179a, salvo por dos diferencias (resumidas en la tabla 3.5.D., por claridad). Primera diferencia, la región VAG de pA14179a que conocemos, insertada entre *nuc* y *fip* (figura 3.5.G.) consta de dos partes. Una de ellas consiste en un transposón Tn6901 que presenta los genes *corA*, *ure2p*, *msrA*, *msrB* y *lysR*, del plásmido MOB_{P4}/IncU pFBATO6, de *Aeromonas caviae* [206] en el lugar ocupado por *mpA* en pA16025a. Estos genes son transportadores de iones metálicos (*corA*, *ure2p*), inactivadores de proteínas, a través de la reducción de residuos metionina (*msrA*, *msrB*) y un regulador de la expresión génica (*lysR*). En el extremo del gen *fip* encontramos el sistema de restricción-modificación *hsd*, más los genes *rve* (integrasa relacionada con los transposones tipo Tn3), *mltE* (transglicosilasa lítica) y *klcB* (antirrestricción). Ni estos ni los anteriores conservan secuencias flanqueantes de elementos móviles. Segunda diferencia, aguas abajo del gen *cggAI* aparecen secuencias típicas de la región CUPS/EST de los plásmidos MOB_{F112}/IncN2. Esto sugiere la presencia de una región CUPS/EST completa en pA14179a, ausente en pA16025a.

En relación al plásmido incompleto pA14179o (figura 3.5.G.) secuenciamos sus módulos MOB y MPF completos, y parte de REP. En estos tres módulos se encuentran todos los genes que definen el chasis P3/IncX, excepto *par*. Sus proteínas son homólogas a las de pBK31567, un plásmido MOB_{P31}/IncX5 [292], incluyendo la relaxasa TaxC, con la que guarda un 98% de identidad de secuencia de aminoácidos (tabla 3.5.E.). Conserva la sintenia de la arquitectura P3/IncX, pero desconocemos el contenido de VAG, aunque es de esperar que sea muy extenso y le proporcione capacidad de multiresistencia.

El gen *taxC* de este plásmido no había sido amplificado durante el análisis de la colección del Hospital Ramón y Cajal (tabla 3.5.A.) por lo que se procedió a analizar su secuencia visualmente. Se observó (no mostrado) que la secuencia completa de la pareja de cebadores DPMT *P3-f*+*P3-r* tiene una identidad del 53% y el 86%, respectivamente, con la secuencia diana. Más importante, el cebador directo tiene desapareado el segundo codón de la secuencia núcleo, en el extremo 3'. Estas dos circunstancias combinadas (pero principalmente la segunda) podrían privar de un soporte adecuado a la polimerasa, abortando la amplificación de *taxC*_pA14179o. Por otra parte, los cebadores expuestos en [13] para la

Sección 3

clasificación del complejo de replicación X en subclases, tampoco serían capaces de amplificar esta *taxC*, al no hibridar correctamente con sus dianas (no mostrado). Estas circunstancias, junto a la identidad de secuencia de *TaxC_pA14179o* y *TaxC_pBK31567*, clasifican nuestro plásmido en el subgrupo IncX5.

No obstante lo anterior, la proteína Pir de *pA14179o* no tiene una alta identidad con la de *pBK31567*, siendo su homóloga más próxima, con un 66% de indentidad, la proteína iniciadora de la replicación Pir_p2ESUM. Esto implica que su replicón está más relacionado con los plásmidos IncX1 que con los IncX5. Las filogenias reconstruidas de *TaxC* y Pir sugieren dos extremos opuestos.

Tabla 3.5.E. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) *pA14179o*.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
<i>taxA</i>	196	Proteína accesoria TaxA del plásmido pBK31567	YP_007215160	1,53E-120	97% (93%)
<i>taxC</i>	387	Proteína relaxasa TaxC del plásmido pBK31567	YP_007215159	0	98% (99%)
<i>actX</i>	164	Probable regulador transcripcional ActX del plásmido pBK31567	YP_007215158	6,92E-116	97% (98%)
<i>hp1</i>	76	Proteína hipotética del plásmido pC02021853_74	YP_002213935	6,49E-29	78% (87%)
<i>pilX1</i>	215	Proteína VirB1, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215157	1,16E-155	97% (99%)
<i>pilX2</i>	127	Proteína VirB2, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215156	8,06E-63	99% (75%)
<i>pilX4</i>	920	Proteína de fusión VirB3/B4, translocadora de sustrato y ATPasa del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215155	0	99% (99%)
<i>pilX5</i>	266	Proteína VirB5 asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215154	2,01E-161	91% (92%)
<i>eex</i>	86	Proteína de exclusión de entrada Eex del plásmido pKpS90	YP_006971160	1,46E-51	89% (98%)
<i>pilX6</i>	352	Proteína VirB6, translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215152	0	91% (100%)
<i>pilX7</i>	43	Proteína VirB7, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215151	2,64E-24	100% (100%)
<i>pilX8</i>	243	Proteína VirB8, translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215150	3,79E-159	97% (99%)
<i>pilX9</i>	310	Proteína VirB9, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215149	0	99% (99%)
<i>pilX10</i>	387	Proteína VirB10, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215148	0	98% (98%)
<i>pilX11</i>	348	Proteína VirB11, ATPasa del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215147	0	98% (100%)
<i>taxB</i>	612	Proteína acopladora, ATPasa del T4SS del plásmido pBK31567	YP_007215146	0	98% (98%)
<i>virB</i>	132	Probable lipoproteína de la familia VirB/Trw/Tra, del plásmido pBK31567	YP_007215145	1,21E-93	98% (99%)
<i>kikA</i>	130	Proteína KikA del plásmido pNGX2-QnrS1	YP_006903169	3,99E-56	83% (69%)
<i>parB</i>	157	Proteína de partición ParB del plásmido pEC14_35	YP_006953680	5,00E-91	78% (99%)
<i>hp2</i>	258	Proteína hipotética del plásmido pSH146_32	YP_006957669	4,23E-81	53% (96%)
<i>hp3</i>	235	Proteína hipotética del plásmido pSG1	YP_456166	8,45E-57	69% (52%)
<i>ydfA</i>	219	Proteína YdfA del plásmido R721	NP_065355	2,77E-15	37% (67%)
<i>topB</i>	780	ADN topoisomerasa III TopB del plásmido pBK31567	YP_007215140	0	99% (100%)
<i>hms</i>	152	Proteína H-NS de unión a ADN del plásmido pBK31567	YP_007215138	2,48E-80	99% (100%)
<i>ardR</i>	99	Proteína hipotética del plásmido pEA3	YP_007714562	1,05E-33	81% (73%)
<i>mpr</i>	283	Metaloproteasa del plásmido pEC14_35	YP_006953672	0	91% (97%)
<i>hp4</i>	129	Proteína hipotética del plásmido pRYCE21	AA168660	2,16E-86	100% (95%)
<i>bis</i>	148	Proteína Bis auxiliadora del inicio de la replicación del plásmido pBK31567	YP_007215117	1,90E-99	95% (99%)
<i>pir</i>	301	Proteína iniciadora de la replicación del plásmido p2ESUM	YP_002381183	5,05E-139	66% (82%)
<i>dnaJ</i>	172	Probable chaperona de tipo Dna-J del plásmido pBK31567	YP_007215166	1,34E-112	98% (100%)
<i>hp6</i>	181	Proteína hipotética del plásmido pBK31567	YP_007215165	2,91E-117	97% (99%)
<i>hp7</i>	94	Proteína hipotética del plásmido pBK31567	YP_007215164	2,88E-56	99% (94%)
<i>yefA</i>	80	Probable regulador transcripcional YajA del plásmido pBK31567	YP_007215163	1,39E-54	99% (99%)
<i>hp8</i>	114	Proteína hipotética del plásmido pBK31567	YP_007215162	1,64E-71	94% (96%)
<i>hp9</i>	86	Proteína hipotética del plásmido pBK31567	YP_007215161	1,47E-56	98% (98%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

Sección 3

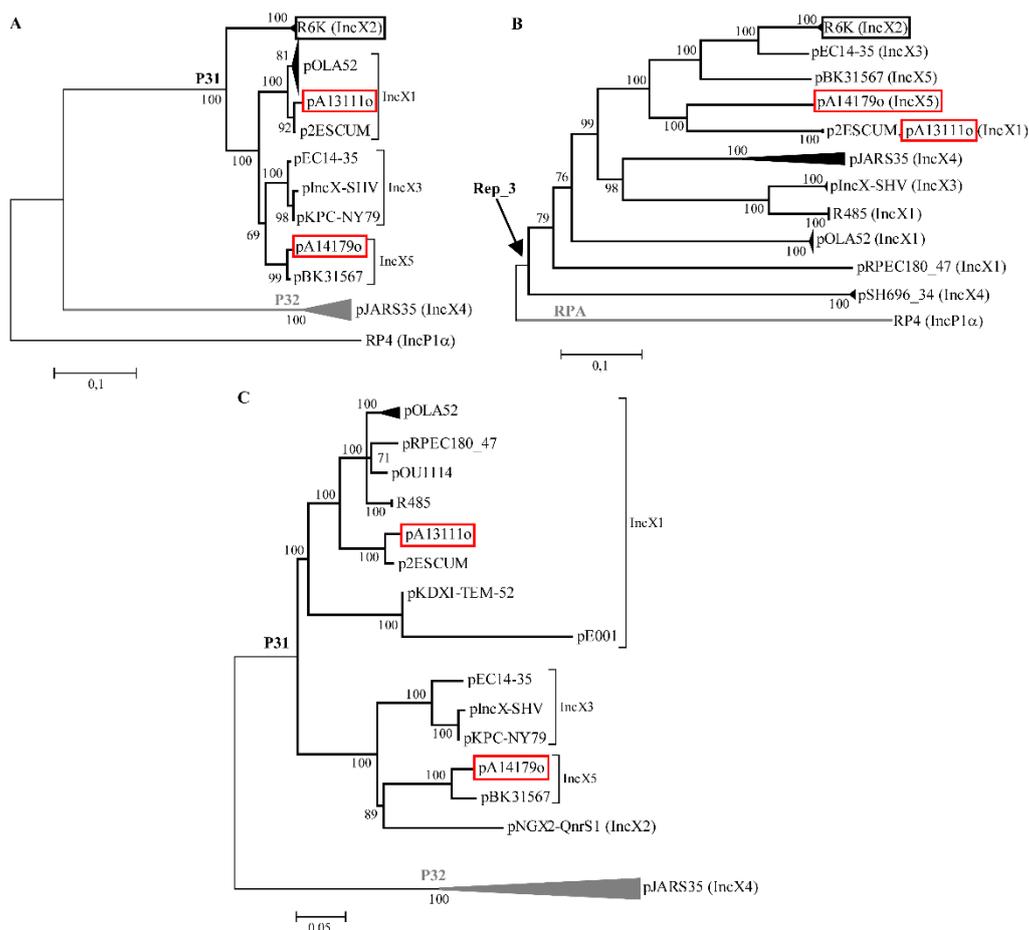


Figura 3.5.H. Filogenia de los plásmidos del complejo de replicación X. Las tres filogenias mostradas fueron construidas por medio de Mega4, tal como se ha explicado anteriormente (Sección 2.3.). El árbol **A** se obtuvo a partir de los 300 primeros aminoácidos de las relaxasas del grupo de replicación. El árbol **B** está construido a partir de la secuencia completa de la proteína iniciadora de la replicación de cada plásmido IncX, Pir. Por último, el árbol **C** está construido en base a las secuencias contiguas de las proteínas del chasis genético de los plásmidos IncX, tal y como se define en [13]. En todos los árboles, menos en el **C**, el plásmido modelo del grupo $MOB_{p3}/IncX$, R6K, aparece recuadrado en negro (no está completamente secuenciado y por ello no aparece en el árbol **B**). Los plásmidos IncX descritos en las secciones 3.4. y 3.5. aparecen recuadrados en rojo. Algunas ramas aparecen comprimidas por claridad de la figura. En cada árbol se indica la familia relaxasa a la que pertenece cada grupo filogenético (árboles **A** y **C**), la superfamilia de cada proteína iniciadora de la replicación (árbol **B**) y el subgrupo del complejo IncX al que pertenecen (todos ellos). Los paneles **A** y **B** indican que pA14179o pertenece alternativamente a los subgrupos X5 y X1, respectivamente. Sin embargo, el panel **C** apoya claramente la topología propuesta en el panel **A**, por lo que afirmamos que forma parte de la rama IncX5, representada hasta ahora por pBK31567 [292].

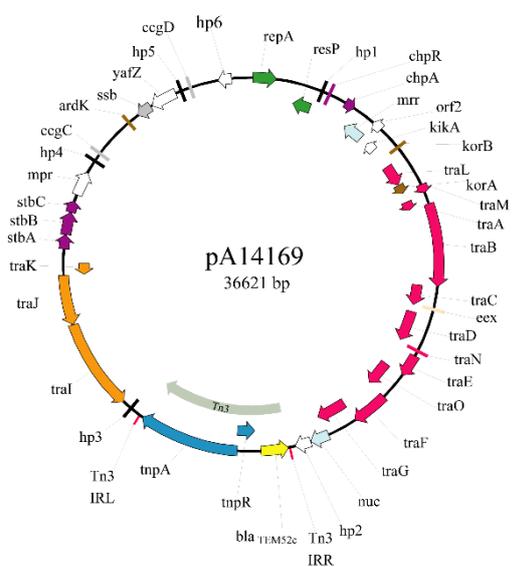


Figura 3.5.I. Mapa genético del plásmido pA14169. La leyenda de la figura es igual que la correspondiente de la figura 3.4.A.-

La filogenia de TaxC indica que pA14179o forma parte del grupo IncX5, mientras que la de Pir (todas de la superfamilia Rep_3) indica que pA14179o forma su propio grupo dentro del complejo X (figura 3.5.H.). Para terminar, la filogenia de los genes considerados parte del chasis básico de los plásmidos IncX (*pir-bis-par-hns-topB-pilX-actX-taxCA*)[13] refuerza la clasificación de pA14179o como plásmido IncX5 que se desprende la filogenia reconstruida con TaxC (figura 3.5.H.).

Sección 3

Secuencia y rasgos generales de los plásmidos IncN-like.

El plásmido pA14169 forma, junto con los plásmidos pA14130a, pA17005a y pA18337a, el grupo denominado IncN-like [290]. Hasta lo que sabemos, no existen plásmidos de este grupo completamente secuenciados. Para el presente trabajo secuenciamos completamente pA14169 y pA14130a. El mapa genético del primero se presenta en la figura 3.5.I. El mapa del segundo es idéntico a éste, al igual que sus características, que pasamos a detallar. pA14169 tiene 36621 pb, 29445 de las cuales codifican un total de 43 ORFs (80.4% de ocupación). De ellos, 36 tienen homólogos de función conocida y los otros 7 no. Los 36 genes identificados se reparten entre los módulos REP, MPF, MOB, STB, EST, REG y VAG.

La mayoría de las proteínas homólogas de pA14169 son del plásmido pN-Cit, el único miembro del subgrupo IncN3 [235] (tabla 3.5.F.). MOB y MPF contienen 20 genes, incluyendo los 11 del T4SS en el módulo MPF, 3 del módulo MOB, 2 del STB y 2 del REG. La presencia de unos MOB y MPF completos en todos los IncN-like secuenciados sugiere que son autotransferibles, al igual que nuestros experimentos (no mostrado). La mayor parte de las proteínas producto de los genes MOB y MPF (y KorA y KorB del módulo REG) tienen como homólogas aquellas del plásmido pN-Cit (NC_020122). La relaxasa de pN-Cit es la más próxima a las de los plásmidos del grupo MOB_{F112}/IncN-like, como ocurre con las demás proteínas MOB y MPF.

Tabla 3.5.F. Genes encontrados en el plásmido pA14169.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
<i>repA</i>	244	Proteína iniciadora de la replicación RepA del plásmido pGOC049	AEM45988	0	100% (100%)
<i>resP</i>	207	Resolvasa ResP del plásmido pN-Cit	YP_007354968	2,94E-109	96% (92%)
<i>hp1</i>	69	Proteína hipotética del plásmido R830b	YP_006964563	6,61E-23	60% (97%)
<i>chpR</i>	82	Antitoxina ChpR del plásmido plasmid_153kb	YP_001393371	1,45E-30	62% (100%)
<i>chpA</i>	109	Toxina ChpA del plásmido pN-Cit	YP_007354970	3,94E-73	97% (100%)
<i>mrr</i>	235	Endonucleasa Mir del plásmido pN-Cit	YP_007354972	3,81E-125	98% (99%)
<i>orf2</i>	105	Proteína Orf2 del plásmido pN-Cit	YP_007354973	3,95E-67	92% (99%)
<i>kikA</i>	108	Proteína KikA del plásmido pN-Cit	YP_007354974	5,32E-49	86% (100%)
<i>korB</i>	78	Probable regulador transcripcional KorB del plásmido plasmII	YP_005994957	7,12E-24	60% (86%)
<i>traL</i>	247	Proteína VirB1, asociada al pilus del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354938	1,21E-179	98% (100%)
<i>korA</i>	106	Regulador transcripcional KorA del plásmido pN-Cit	YP_007354939	2,03E-70	99% (99%)
<i>traM</i>	97	Proteína VirB2, asociada al pilus del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354940	4,23E-59	96% (100%)
<i>traA</i>	105	Proteína VirB3, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354941	1,63E-71	99% (100%)
<i>traB</i>	877	Proteína VirB4, ATPasa del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354942	0	97% (99%)
<i>traC</i>	236	Proteína VirB5, asociada al pilus del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354943	4,87E-151	99% (99%)
<i>eex</i>	79	Proteína de exclusión de entrada Eex del plásmido p9	YP_002286908	3,08E-16	49% (80%)
<i>traD</i>	352	Proteína VirB6, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pN	YP_007354944	0	98% (81%)
<i>traN</i>	57	Proteína VirB7, del core complex del T4SS del plásmido pNCPB880-40	YP_006964190	5,37E-12	55% (75%)
<i>traE</i>	239	Proteína VirB8, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354945	1,76E-178	100% (100%)
<i>traO</i>	296	Proteína VirB9, del core complex del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354946	0	99% (100%)
<i>traF</i>	385	Proteína VirB10, del core complex del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354947	0	99% (100%)
<i>traG</i>	344	Proteína VirB11, ATPasa del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354948	0	100% (100%)
<i>nuc</i>	200	Endonucleasa Nuc del plásmido pN-Cit	YP_007354949	2,47E-139	99% (99%)
<i>hp2</i>	165	Proteína hipotética del plásmido pN-Cit	YP_007354950	4,00E-117	98% (100%)
<i>bla_{TRMS-52c}</i>	287	Proteína TEM-52c del plásmido pKKS0-2	AAB84239	0	100% (100%)
<i>mpR</i>	198	Resolvasa TnpR del transposón Tn3 del plásmido pIP1206	YP_001816608	2,05E-139	100% (100%)
<i>tpA</i>	1055	Transposasa TnpA del transposón Tn3 del plásmido p3521	YP_0041199736	0	100% (100%)
<i>hp3</i>	96	Proteína hipotética del plásmido pKPN4	YP_001338697	5,38E-36	62% (99%)
<i>traI</i>	969	Relaxasa del plásmido pN-Cit	YP_007354951	0	98% (99%)
<i>traJ</i>	526	Proteína acopladora, ATPasa del T4SS del plásmido pN-Cit	YP_007354952	0	98% (99%)
<i>traK</i>	127	Proteína accesoria del relaxosoma TraK del plásmido pN-Cit	YP_007354953	1,24E-81	97% (99%)
<i>stbA</i>	145	Proteína de herencia estable StbA del plásmido pN-Cit	YP_007354954	4,04E-95	95% (99%)
<i>stbB</i>	237	Proteína de herencia estable StbB del plásmido pN-Cit	YP_007354955	1,37E-161	98% (99%)
<i>stbC</i>	123	Proteína de herencia estable StbC del plásmido pN-Cit	YP_007354956	1,57E-72	100% (100%)
<i>mpr</i>	257	Metaloproteasa del plásmido pN-Cit	YP_007354957	2,52E-159	99% (99%)
<i>hp4</i>	81	Proteína hipotética del plásmido pENTAS01	YP_004821587	3,09E-13	48% (86%)
<i>cgcC</i>	96	Proteína CgcC del plásmido pKP96	YP_002332903	7,04E-05	36% (79%)
<i>ardK</i>	101	Proteína ArdR del plásmido pN-Cit	YP_007354962	6,66E-63	96% (98%)
<i>ssb</i>	158	Proteína Ssb del plásmido pN-Cit	YP_007354963	2,41E-89	89% (100%)
<i>yafZ</i>	277	Proteína YafZ del plásmido pN-Cit	YP_007354964	0	100% (100%)
<i>hp5</i>	72	Proteína hipotética del plásmido pET49	YP_001909494	1,68E-08	40% (79%)
<i>cgcD</i>	90	Proteína CgcD del plásmido pEC4115	YP_002268554	9,13E-16	47% (100%)
<i>hp6</i>	140	Proteína hipotética del plásmido pN-Cit	YP_007354965	3,20E-99	99% (99%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

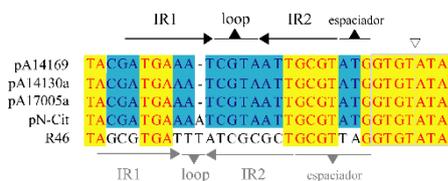


Figura 3.5.J. Alineamiento de los probables puntos de corte del *oriT* y las secuencias asociadas a una posible estructura secundaria.

Se representan las secuencias de los tres plásmidos *IncN-like* de los que hablamos en el texto, comparándolas con las de los modelos *IncN3* (pN-Cit) e *IncN1* (R46). Los componentes del *oriT* de los plásmidos *IncN3* e *IncN4* están señalados en negro, mientras que los de R46 lo están en gris. El recuadro gris claro señala la secuencia conservada que contiene el probable sitio de corte. Éste está señalado igual que en la figura 3.5.D.

flanqueando el elemento encontramos secuencias IR idénticas a las del Tn3 del plásmido *IncI1 unnamed* (EF141186). Por ello, indicamos que el elemento móvil causante del fenotipo observado en el transconjugante A14169 es un transposón de la familia Tn3. Existe un estudio sobre la diversidad de los plásmidos que portan este gen de resistencia en el que se les asocia con elementos móviles tipo Tn3, distribuidos por plásmidos *IncI1*, *IncN-like* e *IncR* [290]. Esto parece apuntar a una cierta asociación preferencial de este gen con un elemento móvil muy concreto y con una serie de replicones plasmídicos.

En cuanto al módulo REP, se compone de proteína iniciadora de la replicación y una resolvasa, organizados según la arquitectura propia de plásmidos *MOB_{F112}/IncN1* clásicos, como R46 [293]. Como ya hemos visto (figura 3.5.B.) la proteína RepA de los tres plásmidos y la de pGOC049 (AEM45988) [290] son idénticas a nivel de secuencia de aminoácidos, perteneciendo todas a la superfamilia Rep₃. Además, todas ellas son un 11,5% idénticas a la RepA del plásmido pN-Cit y pertenece a la superfamilia RepA_C. pN-Cit es el modelo *IncN3* [235] y su relaxasa es la más próxima a la de los plásmidos *IncN-like* (figura 3.5.A.).

Dada la relación entre las RepA de los plásmidos *MOB_{F112}/IncN1* y la de los *MOB_{F112}/IncN-like*, estudiamos los iterones de ambos grupos (figura 3.5.K.). El plásmido pA14169 (y los otros *MOB_{F112}/IncN-like*) presenta, en dirección 3' del gen *repA*, repeticiones imperfectas de una secuencia de 29 pb (figura 3.5.I) en número variable (10 en pA14169, 8 en pA14130a y al menos 1, tanto en pA17005a como en pGOC049, que están incompletos). Al comparar este iterón consenso con el predicho para R46, se observan dos secuencias conservadas (AANNTGGG y TTNCCA) junto con una serie de nucleótidos variables.

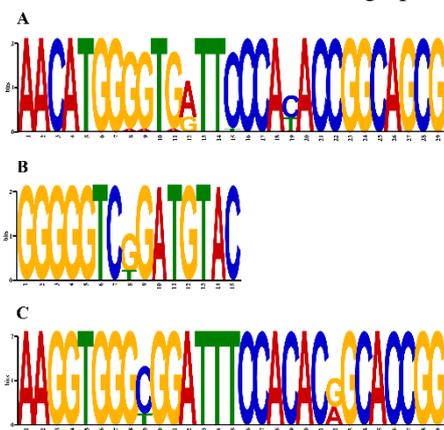


Figura 3.5.K. Logo del iterón consenso de los plásmidos *MOB_{F112}/IncN-like*. Se predijeron, como ya se ha descrito, las secuencias y el número de iterones de los replicones de los A) plásmidos *MOB_{F112}/IncN4* detallados en el texto, comparados con los logos de los plásmidos B) *MOB_{F112}/IncN3* pN-Cit y C) *MOB_{F112}/IncN1* R46. Las alturas de cada base responden a su frecuencia.

A 5' del gen *traK* encontramos el probable *oriT* de pA14169 (coordenadas 27581-27619), una secuencia de 29 pb que se compone de dos repeticiones invertidas y un sitio de corte, separadas por una secuencia sin complementariedad, que formaría un *loop* y una secuencia espaciadora, respectivamente. De toda esta secuencia, únicamente el supuesto punto de corte de TraI (GTGT^ATA) y parte de las secuencias IR corresponden al 100% con las del plásmido *MOB_{F112}/IncN1* R46 (figura 3.5.J.).

Insertado entre los módulos MOB y MPF encontramos un transposón Tn3 que contiene el gen de resistencia frente β -lactámicos *bla_{TEM52-C}*. Además,

Todas las evidencias presentadas (superfamilia RepA, conservación de los iterones y distancia evolutiva entre los genes *traI*) indican que los plásmidos pA14169, pA14130a, pA17005a y pGOC049 forman el mismo sub-grupo de replicación dentro de *IncN*, llamado *IncN-like*.

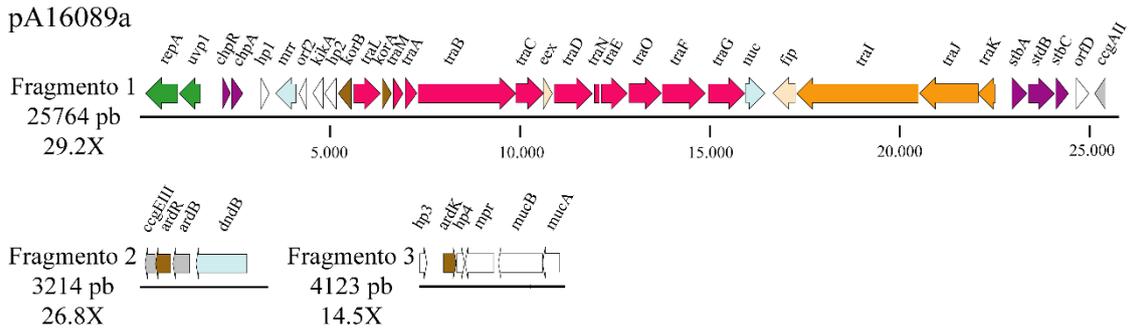


Figura 3.5.L. Mapa genético del plásmido (incompleto) pA16089a. La leyenda es igual que la de la figura 3.4.A.

Secuencia y rasgos generales de los plásmidos IncN4.

El aislado A16089 carga con un total de cuatro replicones amplificables por PBRT (tabla 3.5.A.) y un quinto indetectable, que denominamos IncN4. El plásmido pA16089a (IncN4) tiene, según estudios previos, 93 kb de longitud y carga con una estructura ΔISEc1 [114]. La secuencia obtenida de este plásmido consiste en 33.101 pb, con una cobertura media de 23.5X por posición. Se predijeron un total de 43 ORFs (28.680 pb; 86.7% de ocupación). De ellas, 36 poseen un homólogo de función asignada (figura 3.5.L.).

El fragmento 1 contiene los módulos MOB y MPF completos, el módulo STB (tanto el operón *stbABC* como un módulo toxina/antitoxina de la clase II, familia PemK [294], *chpRA*), el módulo REP y genes sueltos de los módulos REG, MOD y EST (figura 3.5.L.). Los dos fragmentos restantes portan muchos menos genes que el primero, pertenecientes a los módulos EST, REG, MOD (fragmento 2) y REG (fragmento 3). No tenemos secuencias de la región VAG. En la tabla 3.5.G. se resumen los homólogos más próximos de las proteínas del plásmido pA16089a. El rango de identidades entre proteínas de función asignada está entre el 51% y el 100%, correspondiendo los valores más altos a las proteínas del T4SS y el módulo MOB de plásmidos MOB_{F112}/IncN1 como p9 de *K. pneumoniae* (NC_011383). En dirección 5' al gen *traK* se encuentra el probable *oriT* de este plásmido (figura 3.5.M.). Su secuencia guarda gran identidad con la del *oriT* de R46, con la que difiere en una única posición y, en menor medida, con la de los plásmidos MOB_{F112}/IncN2.

En cuanto al módulo REP, lo encontramos en el fragmento 1, donde tenemos la proteína iniciadora de la replicación del plásmido y su resolvasa. La primera RepA de pA16089a pertenece a la superfamilia RepA_C, como la de los plásmidos MOB_{F112}/Inc2 e IncN3 (figura 3.5.B.), siendo un 78% idéntica a la del plasmido MOB_{F112}/IncN2 pJIE137. No conocemos la secuencia del iterón, lo cual nos impide comprobar

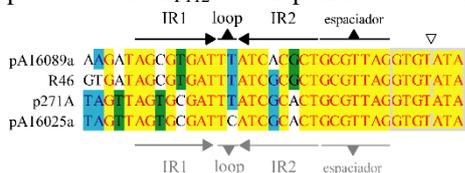


Figura 3.5.M. Alineamiento de los probables puntos de corte del *oriT* y las secuencias asociadas a una posible estructura secundaria. Se representa la secuencia del plásmido IncN4 pA16089a, comparándola con la de los modelos IncN1 (R46) e IncN2 (p271A), así como el del plásmido pA16025a. Los componentes del *oriT* IncN4 e IncN1 están señalados en negro, mientras que los de los plásmidos IncN2 lo están en gris. El recuadro gris claro señala la secuencia conservada que contiene el probable sitio de corte. Éste está señalado igual que en la figura 3.5.D.

si ésta se mantiene o si ha variado en la misma proporción que la secuencia de la proteína iniciadora de la replicación. Por otra parte, no encontramos en ninguno de los fragmentos de este plásmido señales de los genes accesorios que, por fuerza, debe cargar.

Sección 3

Tabla 3.5.G. Genes encontrados en el plásmido (incompleto) pA16089a.

Gen ^a	Longitud ^b	Homólogo más próximo ^c	Acceso	Valor-e ^d	Identidad (Cobertura) ^e
repA	294	Proteína iniciadora de la replicación del plásmido pJIE137	ADI47526	2,99E-142	78% (95%)
uvp1	200	Resolvasa Uvp1 del plásmido p9 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286838	1,29E-111	89% (95%)
chpR	82	Antitoxina ChpR del plásmido plasmid_153kb de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	YP_001393371	7,01E-30	60% (99%)
chpA	109	Toxina PemK del plásmido pN-Cit	YP_007354970	9,78E-60	81% (95%)
hp1	84	Proteína hipotética del plásmido pNDM-HK	YP_006952474	4,44E-07	32% (81%)
mrr	191	Endonucleasa Mrr del plásmido pE66An	YP_007349456	4,56E-76	64% (91%)
orf2	78	Proteína Orf2 del plásmido R46	NP_511182	8,41E-48	100% (100%)
kikA	105	Proteína asesina KikA del plásmido R46	NP_511183	2,88E-68	93% (99%)
hp2	115	Proteína hipotética del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002287011	1,73E-30	89% (98%)
korB	126	Regulador transcripcional KorB del plásmido pLEW517	YP_001096375	9,46E-81	94% (98%)
traL	245	Proteína VirB1, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido p12	YP_002287009	1,34E-158	97% (100%)
korA	94	Regulador transcripcional KorA del plásmido R46	NP_511187	8,56E-60	97% (99%)
traM	98	Proteína VirB2, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido R46	NP_511188	1,76E-60	96% (100%)
traA	115	Proteína VirB3, translocadora de sustrato del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829295	4,98E-76	96% (99%)
traB	867	Proteína VirB4, ATPasa del T4SS del plásmido pKP96	YP_002332880	0	96% (99%)
traC	255	Proteína VirB5, asociada al <i>pilus</i> del T4SS del plásmido pHHA45	YP_006954491	2,04E-145	94% (100%)
eex	93	Proteína de exclusión de entrada del plásmido pEC_L46	YP_003829298	1,54E-48	91% (99%)
traD	346	Proteína VirB6, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido pMUR050	YP_724496	0	92% (100%)
traN	53	Proteína VirB7, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido p12	YP_002286992	2,00E-31	100% (100%)
traE	240	Proteína VirB8, translocadora de sustrato en el T4SS del plásmido p9	YP_002286905	4,48E-175	97% (100%)
traO	295	Proteína VirB9, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829302	0	99% (100%)
traF	388	Proteína VirB10, del <i>core complex</i> del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829303	0	93% (100%)
traG	332	Proteína VirB11, ATPasa del T4SS del plásmido pMUR050	YP_724501	0	95% (100%)
nuc	185	Endonucleasa Nuc del plásmido pKOX_R1	YP_006501590	8,68E-111	95% (99%)
fip	209	Factor de inhibición de fertilidad del plásmido pN3	YP_004558188	2,55E-141	93% (99%)
tral	1080	Relaxasa Tral del plásmido p12	YP_002286953	0	97% (98%)
traJ	528	Proteína acopladora, ATPasa del T4SS del plásmido pEC_L46	YP_003829309	0	92% (99%)
traK	163	Proteína accesoria del relaxosoma del plásmido R46	NP_511203	3,12E-91	96% (85%)
stbA	143	Proteína de herencia estable StbA del plásmido pEC_L46	YP_003829311	1,10E-67	83% (85%)
stdB	239	Proteína de herencia estable StdB del plásmido p9	YP_002286892	2,24E-170	99% (99%)
stbC	123	Proteína de herencia estable StbC del plásmido p9	YP_002286891	1,26E-65	94% (86%)
orfD	126	Proteína OrfD del plásmido R46	NP_511207	3,55E-58	96% (72%)
cggAII	107	Proteína CggAII del plásmido pKC394	YP_003717517	3,31E-63	89% (99%)
cggEIII	85	Proteína CggEIII del plásmido pKP53IL	YP_008076108	4,20E-29	64% (93%)
ardR	127	Proteína de antirrestricción ArdR del plásmido pEC_L46	YP_003829321	2,74E-73	92% (95%)
ardB	142	Proteína de antirrestricción ArdB del plásmido pEC_L46	YP_003829320	2,56E-87	97% (99%)
dndB	426	Proteína DndB del plásmido pKPoxa-48N1	AGL13000	0	74% (99%)
hp3	71	Proteína hipotética del plásmido pKOX105	YP_03675756	1,79E-07	73% (42%)
ardK	120	Regulador transcripcional ArdK del plásmido pRSB201	AEW28794	6,75E-52	76% (95%)
hp4	74	Proteína hipotética del plásmido unnamed de <i>S. enterica</i>	YP_002144978	4,96E-18	51% (93%)
mpr	274	Metaloproteasa Mpr del plásmido pLEW517	YP_001096387	0	93% (100%)
mucB	422	Proteína MucB del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286937	0	95% (100%)
mucA	164	Proteína MucA del plásmido p12 de <i>K. pneumoniae</i>	YP_002286938	4,59E-107	95% (93%)

a. Nombre de cada gen en función de su proteína homóloga más próxima.

b. Longitud del péptido traducido a partir de la secuencia de nucleótidos.

c. Proteína homóloga más próxima.

d. Probabilidad de encontrar la secuencia de aminoácidos problema de manera aleatoria en la base de datos.

e. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre la secuencia problema y su homóloga más próxima. Entre paréntesis, porcentaje de la secuencia de aminoácidos con homología significativa.

SECCIÓN 4: DISCUSIÓN

4.1. Clasificación según replicón frente a clasificación según relaxasa.

Los métodos de clasificación de plásmidos por caracterización del replicón (PBRT) han hecho mucho por la asignación de plásmidos a un grupo Inc determinado, eliminando la necesidad de las pruebas de incompatibilidad clásicas. Sin embargo, existen ciertas desventajas de estos métodos que radican en el propio diseño del método. Por ejemplo, encontramos falsos positivos por hibridación cruzada de plásmidos con grupos de replicación con un origen común (como los grupos IncI, IncK o IncB/O [8, 106]), falsos negativos en la PCR de plásmidos con replicones divergentes (como los plásmidos del grupo IncL/M y los miembros del complejo N [8, 153, 252, 293]) y problemas de detección en grupos de replicación con poca densidad de cobertura (como los plásmidos de tipo ColE1 e IncA/C [10, 295]). Por último, las sondas utilizadas en hibridación [106] y en la amplificación de los replicones [5-13] se diseñan siempre en base a chasis genéticos con alta identidad.

Recientemente se ha desarrollado un método de identificación de replicones basado en el esquema PBRT, pero realizado en un aparato de PCR-tiempo real. Se identifican los amplicones por la curva de

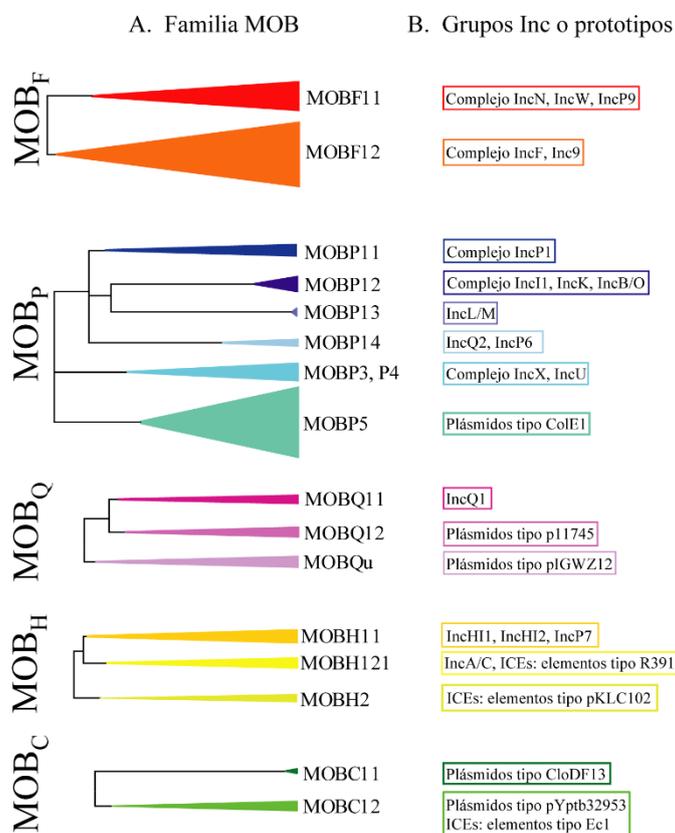


Figura 4.1.A. Correspondencia entre clases MOB y Inc/REP. A) Representación filogenética simplificada de las cinco familias MOB consideradas en el presente estudio. Los triángulos coloreados representan las subfamilias MOB amplificadas por DPMT. Su anchura y profundidad corresponden a la abundancia y diversidad de sus secuencias, respectivamente. B) Los grupos Inc/REP dentro de cada subfamilia MOB se indican en este panel, enmarcados bajo el mismo color. En ausencia de un grupo de replicación definido como grupo de incompatibilidad, se indica un plásmido prototipo.

desnaturalización del mismo, dependiente de su secuencia [296]. Este método obtiene los mismos resultados que PBRT, aunque reduce el tiempo de trabajo. De esta manera, una gran parte de plásmidos, involucrados en la resistencia bacteriana frente a antibióticos y de factores de virulencia, es clasificada

satisfactoriamente. Por otra parte, una importante proporción de la diversidad plasmídica cae fuera de las capacidades de clasificación de PBRT (figura 4.1.A.).

El método de clasificación de plásmidos por amplificación de la relaxasa (DPMT) se ideó como un método para explorar y descubrir diversidad plasmídica que cayera fuera de la metodología de PBRT. Por ello, escogimos amplios grupos de plásmidos, filogenéticamente relacionados, para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos semi-degenerados que acabamos de presentar y validar en las secciones anteriores. Obtenemos así una mayor capacidad para capturar plásmidos invisibles al PBRT, propios de diversos nichos ecológicos, entre ellos el ambiente hospitalario [187, 297-302].

De acuerdo con lo expuesto en trabajos previos sobre diversidad de relaxasas [1, 2, 24, 73], los plásmidos conjugativos y movilizables son clasificados en ocho familias distintas: MOB_F, MOB_P, MOB_Q, MOB_H, MOB_C, MOB_V, MOB_T y MOB_B. Dentro de ellas, las relaxasas de los distintos plásmidos se agrupan según su grado de identidad en las secuencias de aminoácidos. Los mayores porcentajes de identidad (y por tanto, la mayor conservación de secuencia) ocurren en los motivos que definen a las relaxasas como tales (es decir, los motivos catalítico, activador y coordinador del catión metálico divalente) y sobre ellos se diseñaron los oligonucleótidos de DPMT. Al abarcar relaxasas con identidades de secuencia bajas nos aseguramos de que DPMT sea una potente herramienta para la detección de plásmidos con relaxasas bien caracterizadas y para el descubrimiento de otras nuevas, en diversos ambientes del conocimiento, como la clínica, la veterinaria o las ciencias ambientales [4].

Para la redacción del presente trabajo de tesis doctoral, las filogenias contenidas en trabajos previos [1, 2, 24, 73] fueron actualizadas, ciñéndonos a los plásmidos nativos de \square -proteobacterias por la importancia en clínica y epidemiología de estas moléculas. Referimos a las figuras de la sección 3.1. para mayor detalle. En cualquier caso, 17 subfamilias reúnen la mayoría de la diversidad dentro de las relaxasas de plásmidos de \square -proteobacterias (figura 4.1.A.): F11 y F12 son subfamilias de MOB_F (figura 3.1.A.); P11, P12, P13, P14, P3, P4 y P5 son subfamilias de MOB_P (figuras 3.1.B. hasta 3.1.D.); Q11, Q12 y Qu son subfamilias de MOB_Q (figura 3.1.E.); H11, H12 y H2 son subfamilias de MOB_H (figura 3.1.F.); y C11 y C12 son subfamilias de MOB_C (figura 3.1.G.). En estas 17 subfamilias se incluyen la mayoría de los plásmidos detectables por el método DPMT, exceptuando aquellos grupos de plásmidos sin relaxasa conocida (concretamente, IncR, GR1/GR12, GR2/GR10, GR13, GR14, y GR17, cuyos plásmidos prototipo son pK245, pABSDF, pACICU1, p3ABAYE, p4ABAYE, y pAB1, respectivamente) o grupos de replicación sin un prototipo completamente secuenciado que permita un análisis en busca de su relaxasa (como IncY, IncFVI, IncFVII, GR3, GR4, GR5, GR8 y GR16, cuyos prototipos serían P1, pSU212, pSU221, p736, p844, p537, p11921, y pAB49, respectivamente). No consideramos las familias y subfamilias que tuvieran pocos miembros dentro de la clase \square -Proteobacteria. Las más notables de estas excepciones son los plásmidos de la subfamilia MOB_{P6} (que incluyen a los plásmidos de resistencia IncI2) y la familia MOB_V completa (ver la tabla suplementaria S1). Del mismo modo, las relaxasas agrupadas en taxones poco resueltos (es decir, con pocos miembros o con relaciones filogenéticas muy lejanas) tampoco fueron considerados al diseñar los oligos DPMT. Ejemplos de esta excepción son el plásmido IncT Rts1, cuya relaxasa está aislada en la filogenia de MOB_H (figura 3.1.F.) o los plásmidos IncQ3 (figura 3.1.B.). Es de esperar que MOB_{P6}, MOB_V y los grupos IncT, IncQ3 y otros, incrementen la diversidad que contienen en un futuro próximo, de manera que sea interesante considerar el incluirlos en el esquema DPMT.

Para evaluar y comparar la amplitud de la diversidad plasmídica detectable por los métodos PBRT y DPMT (esto es, cuántos plásmidos pueden amplificarse con los dos métodos) empleamos una base de datos que contiene todos los plásmidos de γ -Proteobacteria disponibles en la base de datos del NCBI a fecha de principios del año 2009 [73] y que presentamos modificada en forma de la tabla suplementaria S1. Esta tabla contiene 503 plásmidos, 260 de los cuales contienen una o más relaxasas (en total, en estos 260 plásmidos hay 271 relaxasas). Procedimos a evaluar la posibilidad de amplificar cada plásmido, utilizando tanto los oligonucleótidos del esquema PBRT, referidos en secciones anteriores, como los del esquema DPMT, del modo expuesto en la Sección 2. En resumen, las 19 sondas DPMT pueden detectar potencialmente un total de 193 de las 271 relaxasas presentes en la base de datos de 503 plásmidos (transmisibles y no transmisibles) de γ -Proteobacteria. Estos 193 genes están contenidos en 186 plásmidos transmisibles (36.9%). Las 58 sondas PBRT disponibles pueden detectar 153 plásmidos del total de 503 analizados (30.4%), 98 de los cuales corresponden a plásmidos transmisibles. En conclusión, 87 plásmidos (de 260 plásmidos transmisibles) pueden ser potencialmente detectados por ambos esquemas clasificatorios (33.5%). Esta aproximación teórica sugiere que DPMT es un método muy eficaz (al menos tanto como PBRT) para clasificar la diversidad plasmídica dentro de la clase γ -Proteobacteria.

Antes de utilizar los oligonucleótidos DPMT en el análisis de colecciones de aislados, comprobamos su especificidad sobre una colección de relaxasas tipo, descrita previamente (tabla 2.4.A.) y ante los cromosomas de los distintos huéspedes bacterianos empleados en este trabajo, (tabla 2.1.A.). Como hemos visto en la sección 3.1., en general no se producen reacciones cruzadas al amplificar la colección de relaxasas tipo, a excepción de las parejas de cebadores *F12-f+F12-r* y *P131-f+P1-r*. La amplificación inespecífica debida a *F12-f+F12-r* desaparece al utilizar en la PCR una polimerasa comercial. La polimerasa utilizada habitualmente no estaba libre del ADN vectorial utilizado en su sobre-expresión, lo que puede explicar esta reacción cruzada. Sin embargo, esto no explica por qué el resto de controles F11 no amplifican por la misma reacción cruzada. Así que la conclusión lógica ha de ser que la secuencia de *trwC* de R388 permite que los oligos de la pareja F12 hibriden y amplifiquen en las condiciones de reacción utilizadas. Los demás controles no permiten esto y por eso no hay más reacciones cruzadas. La inespecificidad producida por los cebadores *P131-f+P1-r* es de un tamaño aproximado de 400 pb, por lo que es claramente distinguible de un verdadero positivo.

Dado que en la construcción de la genoteca de relaxasas se utilizó un trasfondo cromosómico común, la capacidad del método DPMT para evitar la amplificación de una sección del cromosoma bacteriano solo queda demostrada para el caso de *E. coli* DH5 α . Realizamos la PCR, con las 19 parejas de oligonucleótidos DPMT, sobre muestras de ADN total (cromosómico) de las cepas utilizadas durante todo el presente trabajo (tabla 2.1.A.) y no se produjeron reacciones de amplificación cruzada (no mostrado). Sin embargo, durante el análisis de las distintas colecciones de aislados clínicos, hemos visto que la pareja de cebadores *P4-f+P4-r* amplifica inespecíficamente el gen *fucO* del cromosoma de *Salmonella enterica* (sección 3.3.). El problema solo pudo ser solucionado cambiando de huésped por conjugación el plásmido diana. También observamos amplificación inespecífica en las parejas de oligonucleótidos *H11* y *C11* (sección 3.1), pero en los dos casos se pudo corregir este problema variando las condiciones de la PCR. Se hace necesaria una revisión y replanteamiento de esta pareja de oligonucleótidos, de modo que se eviten nuevas amplificaciones indeseadas y se simplifiquen los protocolos a utilizar.

Comprobamos la capacidad para la detección de los cebadores DPMT, analizando seis colecciones de aislados bacterianos, cinco de origen hospitalario y una de origen ambiental. En total, las seis colecciones constan de 340 aislados, que habían sido caracterizados con distintos juegos de sondas PBRT, según las necesidades del laboratorio de procedencia. 273 de estos aislados portaban plásmidos caracterizados por PBRT. Por otra parte, en los 67 aislados restantes no era así, lo que supone un 19.7% del total analizado. En nuestro trabajo, de los 340 aislados analizados por DPMT, solo 19 quedaron sin poder ser clasificados (sección 3.2.), lo que representa solo un 5.6% del total. Que en algunos aislados bacterianos, con probada capacidad conjugativa, no se detecte relaxasa alguna, puede deberse a diferentes factores, entre los que cabe destacar: i) el sesgo en la degeneración del código introducido en algunas parejas de oligonucleótidos para controlar su grado de degeneración, ii) la presencia de relaxasas no incluidas en el rango de dianas durante el diseño de oligonucleótidos o iii) la presencia en estas cepas de genes de relaxasas altamente desviados de las secuencias consenso de cada subfamilia. En cualquier caso, los resultados de caracterización expuestos indican que DPMT es capaz de detectar más del 95% de los plásmidos de resistencia contenidos en transconjugantes de aislados clínicos, de relevancia epidemiológica. El incremento, en el futuro, del conocimiento sobre la diversidad de familias de relaxasas y taxones poco poblados permitirá ampliar el método DPMT, incrementando este porcentaje de detección.

Las características de los métodos PBRT y DPMT en cuanto a su capacidad (teórica y empírica) para detectar plásmidos transmisibles ponen de manifiesto que estos dos métodos son complementarios, antes que excluyentes. Los oligonucleótidos del esquema PBRT están diseñados para reconocer genes implicados en replicación y partición de chasis genéticos con un alto grado de identidad en la secuencia de nucleótidos (hasta de un 95%). Por otra parte, los oligonucleótidos DPMT permiten la identificación de relaxasas con un grado de divergencia relativamente alto respecto de las secuencias utilizadas en el diseño de los mismos. Por ejemplo, relaxasas con un porcentaje de identidad tan bajo como el 45.6% (en secuencia de aminoácidos) con su homólogo más próximo, pueden ser identificadas por la misma pareja de oligonucleótidos DPMT (sección 3.2.). En consecuencia, el método PBRT es útil para detectar “afloramientos” de chasis genéticos idénticos, con diversos módulos de genes accesorios (estrategia de *zoom in*) dada la particularidad en el diseño de sus sondas no degeneradas, en base a un (o unos pocos) plásmido modelo concreto. Por otra parte, DPMT será una herramienta muy útil para encontrar y clasificar plásmidos con un ancestro común del gen de su relaxasa (estrategia *zoom out*) ya que considera un conjunto de proteínas relacionadas filogenéticamente para diseñar oligonucleótidos semidegenerados [14].

Otra característica que diferencia a ambos métodos es que PBRT está diseñado principalmente para la detección de plásmidos en Enterobacteriaceae [8, 10, 11, 108, 169], con algunas excepciones, como las de los plásmidos del complejo IncP1 [5, 9, 107], IncP9 [6, 7] y los nativos del género *Acinetobacter* [12]. El diseño de esta aproximación empírica es útil para propósitos concretos, como la detección rápida en hospitales de algunos tipos de plásmidos de resistencia conjugativos, pero fracasan al explorar la diversidad global, tanto ambiental, como hospitalaria, como demuestra la presencia de un considerable porcentaje de aislados con plásmidos inclasificables (el 19.7%) entre las colecciones analizadas (sección 3.2.) y en diversos ejemplos bibliográficos [132, 297, 303-305]. DPMT es una estrategia más inclusiva, que permite la detección de plásmidos con un rango de huéspedes mayor, al incorporar al diseño de sus parejas de oligonucleótidos un número discreto de genes filogenéticamente relacionados y seleccionar una

secuencia consenso semidegenerada. La reducción hasta la cuarta parte (5.6%) del número de plásmidos sin clasificar demuestra este extremo. Sin embargo, DPMT también presenta un sesgo en cuanto que recupera más de un 85% de secuencias de plásmidos hospedados por Enterobacteriaceae. Esto es debido a la mayoritaria presencia de este tipo de plásmidos en las bases de datos en respuesta al esfuerzo en la investigación de esta clase de bacterias [2, 73]. En algunos casos concretos, como los plásmidos de Shewanellaceae con relaxasas MOB_F (figura 3.1.A.), el incremento en el número de secuencias y su robusta topología, permitirían la ampliación del método DPMT con una nueva pareja de oligonucleótidos. En otros casos, como los ya señalados plásmidos MOB_{P6}, MOB_V, IncT, IncQ3, o los de familias como Moraxellaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae y Aeromonadaceae, es aún necesario añadir mayor diversidad antes de incorporarlos al esquema DPMT de forma eficaz.

Por último, debido a la estrategia *zoom out* empleada en su diseño, cada pareja de cebadores DPMT puede amplificar relaxasas relacionadas filogenéticamente, con un grado de conservación de la secuencia muy bajo, presentes en plásmidos de grupos de replicación compatibles. Esto implica que ambas relaxasas serían irreconocibles por secuenciación. El array en suspensión permite evitar este problema, a la vez que reduce los costes de la identificación, al incluirla en una plataforma *high throughput*.

En conclusión, los métodos DPMT y PBRT, lejos de ser excluyentes, se complementarían perfectamente a la hora de detectar y clasificar los plásmidos transmisibles portadores de resistencia a antibióticos más frecuentes. Del mismo modo, DPMT ayudaría a que se diseñaran oligonucleótidos PBRT para todos aquellos grupos de nuevos plásmidos descubiertos. El incluir en el flujo de trabajo la identificación por array en suspensión de las relaxasas amplificadas, reduce el tiempo de espera, el coste del proceso y añade información relevante para el epidemiólogo.

Ya hemos visto que hay casos en que relaxasas del mismo grupo MOB, coexistiendo en el mismo aislado bacteriano, son amplificadas con una misma pareja de cebadores DPMT. Los amplicones así generados serían una mezcla de moléculas de ADN, todas de una misma (sub-)familia MOB. La secuenciación clásica de estos productos mezclados produciría un cromatograma que no aportaría información sobre esas relaxasas. Este problema ha surgido repetidamente durante el análisis de las colecciones de aislados, sobre todo con aquellos que contenían varios plásmidos del complejo de replicación I. El uso sistemático del sistema BioPlex200 sobre los amplicones P12⁺ nos permitió ahorrar tiempo y distinguir e identificar las relaxasas P12 mezcladas, en este ejemplo concreto.

4.2. Análisis de los plásmidos secuenciados.

Uno de los principales objetivos de esta tesis era utilizar el método DPMT para describir plásmidos nuevos. La aparición de aislados bacterianos con plásmidos que no podían ser amplificados con ninguna de las parejas de oligonucleótidos diseñados para tal fin resultó ser una fuente de nueva información muy atractiva. Secuenciamos parcialmente seis plásmidos conjugativos o movilizables, provenientes de las colecciones analizadas (sección 3.3.). Sus probables relaxasas no pudieron ser amplificadas con ninguno de los iniciadores DPMT. En primer lugar, hablaremos del único plásmido ambiental secuenciado sobre los plásmidos de la subfamilia MOB_{F11} secuenciados y, en segundo lugar, del resto, con especial interés en ambos casos, en las secuencias completas.

El plásmido pBFp1, representante de la sub-familia MOB_{P63} de plásmidos movilizables.

El plásmido pBFp1 fue aislado del puerto de Göteborg un ambiente marino contaminado por la actividad portuaria humana, mediante la técnica de aislamiento exógeno [132]. Brevemente, una muestra de bacterias nativas se puso en contacto con una célula recipiente de fenotipo conocido y se permitió la conjugación entre ambas. Los transconjugantes son seleccionados posteriormente en función del fenotipo de la célula receptora y de algún rasgo que se quiera estudiar, en este caso la tolerancia a metales pesados como el mercurio [132].

Como hemos visto en la Sección 3.3., pBFp1 es un mosaico genético compuesto de seis módulos funcionales (REP, STB, MPF, MOB, REG y VAG). La mayoría de sus proteínas son homólogas a las de los plásmidos pXap41 (MOB_{P6}), R7K (MOB_{F111}/IncW) y pIPO2T (MOB_{P42}/PromA) (tabla 3.3.I.).

En lo que se refiere a la replicación, los plásmidos pBFp1, R7K y pIPO2T (así como los grupos que estos dos últimos representan) tienen proteínas iniciadoras de la replicación homólogas (30.9% y 31.3% con RepA_{pBFp1} respectivamente) [134, 287, 306]. Las tres proteínas pertenecen a la superfamilia RepA_C, que a su vez pertenece al clan *helix-turn-helix* (HTH) de iniciadores de la replicación [307]. Igualmente, conservan la secuencia del iterón de sus respectivos *oriV*, como ya hemos visto (figura 3.3.K.). Esto indica que los tres grupos de plásmidos comparten un mismo mecanismo de replicación, denominado □ [287]. Se ha comprobado experimentalmente que los plásmidos pBFp1 y pSa (IncW) son incompatibles [134], mientras que pBFp1 y pIPO2T son compatibles, probablemente por la mayor divergencia de secuencia de sus RepA respectivas, pero también por las diferencias en su *oriV* (figura 3.4.I.) [287, 300]. No existen experimentos de incompatibilidad entre plásmidos IncW y PromA.

Los plásmidos que forman complejos de replicación, como I/K/B/Z [100, 191], comparten una serie de genes conservados, llamados *backbone*, organizados según una arquitectura común (sintenia) que implica una historia evolutiva compartida. Cuando consideramos los plásmidos P6/W/PromA no encontramos un conjunto de genes que cumplan estas características, es decir, no existe un grupo de genes conservados común a todos ellos, que estén guardando la sintenia. Es más, ni siquiera considerando únicamente los plásmidos dentro de la subfamilia MOB_{P6} se puede encontrar un *backbone* común, con una sintenia conservada (ni siquiera comparando módulos aislados, como MOB y MPF; figura 4.2.A.). En otras palabras, los plásmidos pBFp1, F111/IncW y P42/PromA no forman un complejo de replicación relacionado evolutivamente por un ancestro común.

El plásmido pBFp1 pertenece a la subfamilia MOB_{P6} de relaxasas y su MPF (incompleto) se clasifica como de tipo T, de acuerdo con las homologías de sus proteínas TraF y TraH (no mostradas). MPF_T es una de las familias más numerosas en las que se clasifica este módulo, asociada mayoritariamente con plásmidos conjugativos MOB_P [73]. Sin embargo, en el caso de pBFp1 se trata de un MPF_T incompleto, al que le faltan los genes característicos de este tipo de MPF [73]. Aunque ha sido descrito como conjugativo [132] los experimentos realizados aquí, en ausencia de posibles plásmidos movilizadores, en distintos trasfondos cromosómicos y entre distintas parejas de células donantes y receptoras, demuestran que pBFp1 no es capaz de conjugar por sí mismo (sección 3.4.).

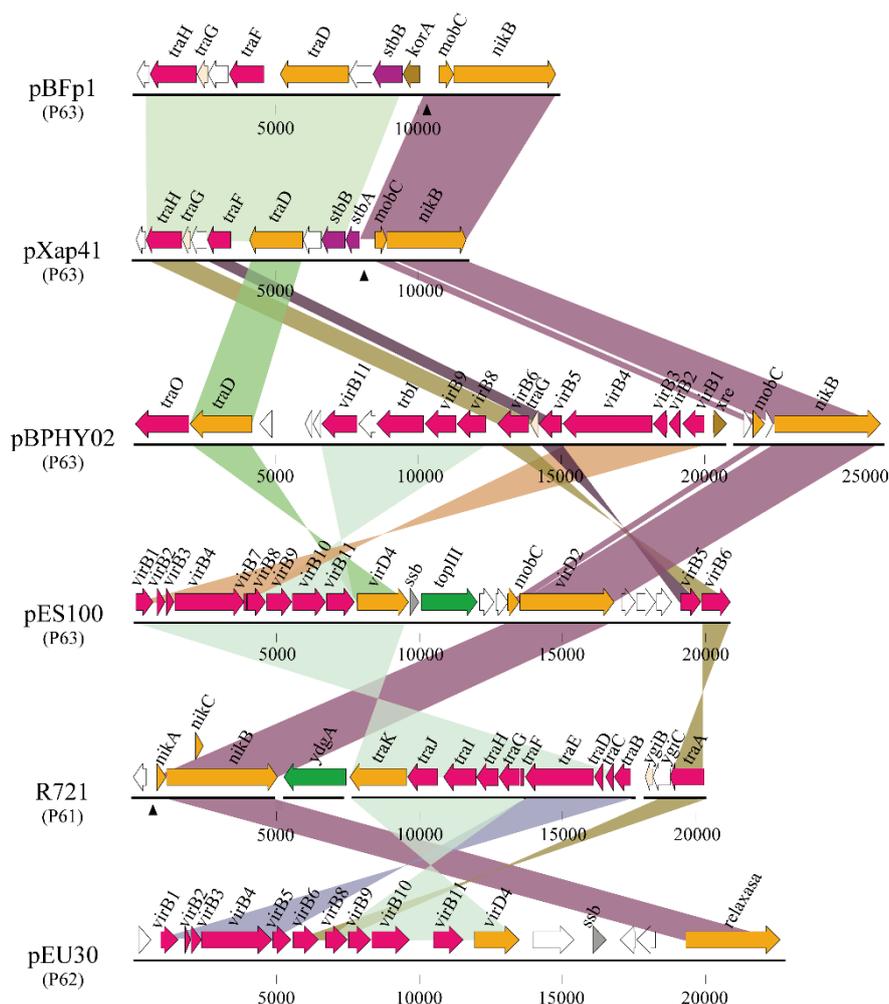


Figura 4.2.A. Arquitectura comparada de los módulos MOB y MPF de los distintos plásmidos P63, así como de otros representantes de MOB_{P6}. Los códigos de colores son los mismos que en los mapas de la sección 3 (por ejemplo, la figura 3.3.A.). En colores se indican regiones que contienen genes con funciones semejantes por predicción, independientemente del grado de identidad de sus secuencias. Esto se hace para que se observe cómo cambian las arquitecturas de MOB y MPF a lo largo de MOB_{P6}. Los plásmidos están nombrados a la izquierda de sus representaciones, con el subgrupo MOB al que pertenecen entre paréntesis. En las representaciones, los huecos blancos de las secuencias indican una discontinuidad, ocupada por genes no relacionados con los módulos estudiados. Las cabezas de flechas negras indican la posición de los probables *oriT*. Los tamaños (en pb) de cada secuencia representada se indican con números bajo las mismas.

El plásmido pBFp1 contiene, como ya hemos visto, módulos MOB, MPF y el gen T4CP. El MPF_T en pBFp1 solo contiene tres genes: *traF*, *traG*, y *traH*. Su identidad es máxima con la de pXap41 (67%). La búsqueda de homólogos de estas dos secuencias con BLASTn únicamente arrojan coincidencias significativas consigo mismas y con segmentos de los MPF_T completos de otros plásmidos (principalmente, del grupo P42/PromA).

A la vista de la filogenia de la relaxasa MOB_{P6} y la proteína TraH (figura 3.4.H.), la relación entre las proteínas iniciadoras de la replicación y la sintenia de los plásmidos del grupo (figura 3.4.J.), vemos que resulta complicado obtener una conclusión sólida sobre la evolución de los plásmidos de este grupo. Sin embargo, se puede conjeturar sobre el origen de la rama P63. La arquitectura de sus módulos MOB y MPF

sugiere que esta rama se originó como resultado de una serie de eventos de recombinación homóloga entre un ancestro común de ambos plásmidos con otros de distintos grupos de replicación, cuando compartían huésped. El resultado de este proceso fueron dos plásmidos, pBFp1 y pXap41, que combinan una MOB_{P6} con un MPF_T incompleto y un replicón no relacionado. La ausencia de un T4SS suficiente como para ser funcional sugiere que ninguno de estos plásmidos es conjugativo, lo que está de acuerdo con las evidencias obtenidas con pBFp1. Por último, sobre el chasis común se insertaron elementos móviles que permitieron la diversificación de nichos en los que competir con éxito, bien en el medio marino (pBFp1) o como patógeno vegetal (pXap41).

Plásmidos MOB_{F112}.

Entre las cinco colecciones de aislados hospitalarios analizadas hemos encontrado y caracterizado (parcial o completamente) un total de siete plásmidos de tipo MOB_{F112}. Codifican todos ellos relaxasas ligeramente distintas a las de otros plásmidos previamente descritos, pero cada uno exhibe particularidades que los hacen únicos e importantes. Las relaxasas de los plásmidos pA14169, pA14130a, pA17005a y pA18337a son 98% idénticas a la del plásmido MOB_{F112}/IncN3 pN-Cit [235]. Igualmente, la mayor parte de sus proteínas guardan una alta homología con las de este plásmido. Sin embargo, sus RepA son idénticas a la del plásmido pGOC049 [290].

pGOC049 es un plásmido asociado a la expansión del gen *bla*_{TEM-52c} a bordo de un elemento Tn2. Las cepas que contenían pGOC049 fueron aisladas de aves de corral [308] y de brotes bacterianos provenientes de carne de consumo humano [217]. Mientras, las cepas que nosotros hemos analizado provienen de tres ámbitos hospitalarios separados temporal y espacialmente (Madrid [1995 y 2002], Barcelona [2007-2008] y Santander [2004-2005]). Por tanto, nuestro trabajo implica que este gen de resistencia se ha asociado a un tipo muy concreto de plásmido, perteneciente a un grupo MOB (F112) y a uno REP (IncN-like) que, hasta donde sabemos, solo se encuentra en España y al menos desde el año 1995. Este plásmido aparece asociado al circuito de producción de aves de corral para el consumo humano y al de comercialización de su carne, se ha instalado en seres humanos y ha acabado en el ámbito hospitalario. Existen referencias a *bla*_{TEM-52c} en otros trabajos, de cepas aisladas de humanos sanos y animales, tanto en Portugal [309] como fuera de la Península [310, 311]. Estos estudios se centran en la caracterización de los genes de resistencia presentes en cada aislado y dejan de lado la clasificación de los replicones de los plásmidos que los contienen. Sin embargo, de ellos se podría inferir que la distribución del grupo MOB_{F112}/IncN-like es más amplia de lo sugerido por los datos disponibles y que, dado este éxito ecológico, este grupo de plásmidos puede suponer un problema sanitario en el corto o medio plazo.

Los plásmidos pA16025a, pA16042a y pA14179a forman parte del grupo MOB_{F112}/IncN2, que contiene los plásmidos p271A, pJIE137, pTR3 y pTR4 [153, 168, 252]. Ninguno puede ser caracterizado por medio del esquema PBRT actual. El subgrupo de replicación IncN2 había sido inicialmente relacionado con la dispersión del gen *bla*_{NDM-1} en la región Asia-Pacífico [153, 312] y como vehículo de adquisición del gen *bla*_{CTX-M-62} [252] o de otros determinantes de resistencia [313]. El plásmido p271A puede considerarse modelo de este grupo por la sencillez del módulo VAG que exhibe. Sin embargo, los plásmidos secuenciados por nosotros cargan todos con VAG de complejidad elevada que, en ningún caso, contienen estos dos genes de resistencia [312]. Exceptuando pA14179a (del que desconocemos el dato), los plásmidos secuenciados cargan con un gen *bla*_{ACC-1}, dentro de un elemento Δ ISEcp1 [114], insertado dentro de los

límites de un elemento *In4* (figura 3.5.D.; pA16042a no mostrado). La comparación del resto de su secuencia sugiere, al observarse una identidad tan alta con sus homólogos más próximos, que la adquisición de estos VAG es realmente reciente, por lo que estaríamos ante un muy reciente evento de diversificación.

Por otra parte, la secuencia del plásmido pA16089a, aunque incompleta, sugiere la existencia de un quinto subgrupo de replicación dentro de *IncN*, caracterizado por un chasis prácticamente idéntico al del subgrupo *IncN1* en cuanto a los módulos MOB, MPF y STB y por poseer una RepA homóloga a RepA_pJIE137 (otro *IncN2*; 78% de identidad). Esto concuerda con que no se pudiera amplificar su replicación por medio de PBRT. La conservación de los módulos MOB, MPF y STB y la divergencia de las distintas RepA sugieren que los plásmidos *IncN1*, *IncN2* e *IncN4* provienen todos de la diversificación de un único plásmido original.

En el aislado A14179, correspondiente a la colección del Hospital Ramón y Cajal, apareció un segundo plásmido, pA14179o, cuya secuencia incompleta se corresponde con la de un plásmido MOB_{P3}/*IncX*. Según el esquema de clasificación por incompatibilidad, el complejo de replicación X se clasificó en dos clases (X1 y X2) [105]. Recientemente, se ha expandido el número de subgrupos, atendiendo a la conservación del *backbone* y a la filogenia reconstruida en base a los SNPs de las secuencias de estos genes [13]. En este trabajo, Johnson y colaboradores presentaron una serie de nuevas sondas para la clasificación de los plásmidos *IncX*, basadas en la amplificación del gen de la relaxasa, *taxC* por medio de cebadores no degenerados. Los subgrupos *IncX* utilizados para el diseño de los cebadores presentados tenían siempre homología superior al 92%. Esta estrategia, ya utilizada en el diseño de los cebadores PBRT, produce un juego de sondas con los mismos problemas que hemos referido antes. De hecho, como ya hemos dicho, al comparar la secuencia diana de *taxC*_pA14179o con la de los cebadores apropiados para el grupo *IncX5*, vemos que se va a producir un error en el apareamiento de las bases. Por tanto, no se amplificaría *taxC* y este plásmido no sería clasificable. También sería necesario revisar las secuencias de los cebadores DPMT-P3 para permitir la amplificación de este gen y sus homólogos cercanos.

Este análisis recalca la capacidad del método DPMT, para detectar plásmidos que poseen replicones más o menos divergentes respecto de las dianas consenso utilizadas para el diseño del método PBRT. Sin embargo, como ya hemos dicho, no se trata de métodos excluyentes, sino complementarios, que permiten un análisis más profundo de la diversidad de los plásmidos de resistencia menos comunes.

SECCIÓN 5: CONCLUSIONES

1. Hemos desarrollado una batería de 19 parejas de cebadores semidegenerados que permiten la amplificación específica de relaxasas de plásmidos transmisibles de γ -Proteobacteria, en base a la clasificación MOB descrita en varios trabajos previos.
2. El método de clasificación de MOB por cebadores degenerados (DPMT) ha demostrado, tanto *in silico* como *in vitro*, su capacidad para clasificar de manera específica y exhaustiva, plásmidos transmisibles de diferentes orígenes y con características que los hacen importantes para los asuntos de los hombres.
3. Hemos demostrado que el método DPMT posee más poder analítico que los métodos de identificación de plásmidos basados en la amplificación del replicón. Todas las colecciones de aislados analizadas (excepto la del HUMdV) contenían casos sin grupo de replicación asignado. Muchos de estos casos han sido resueltos con la metodología DPMT.
4. Sin embargo, ambos métodos deben ser complementarios, dado que también han aparecido casos en los que DPMT ha sido incapaz de amplificar una relaxasa contenida en un plásmido con un replicón amplificado por PBRT.
5. Tanto DPMT como el sistema de identificación de relaxasas por array en suspensión, necesitan ser mantenidos al día, añadiendo al diseño de las parejas de cebadores degenerados y de las sondas del array, la diversidad genética que vaya apareciendo en el mundo de los plásmidos.
6. PBRT, DPMT, el array en suspensión y la secuenciación completa de los plásmidos son los pasos consecutivos de un protocolo rápido y barato de identificación de plásmidos. Su versatilidad permite que sea utilizado tanto en el entorno clínico, como en el de la investigación epidemiológica.
7. El análisis de las colecciones de aislados por medio de DPMT y el array en suspensión ha permitido describir un total de 18 nuevos plásmidos, algunos de los cuales representan nuevas ramas dentro de sus correspondientes árboles filogenéticos (e.g. pA16089a, pA14130 o pA14169a), mientras otros representan a grupos de plásmidos ya conocidos (e.g. pBFp1, pA14179a o pA15229a).

BIBLIOGRAFÍA

1. Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS microbiology reviews*. 2004;28(1):79-100. PubMed PMID: 14975531.
2. Garcillan-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(3):657-87. PubMed PMID: 19396961.
3. Garcillan-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS microbiology reviews*. 2011;35(5):936-56. PubMed PMID: 21711366.
4. Alvarado A, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PloS one*. 2012;7(7):e40438. doi: 10.1371/journal.pone.0040438. PubMed PMID: 22792321; PubMed Central PMCID: PMC3394729.
5. Gotz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschape H, et al. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and environmental microbiology*. 1996;62(7):2621-8. PubMed PMID: 8779598.
6. Greated A, Thomas CM. A pair of PCR primers for Incp-9 plasmids. *Microbiology (Reading, England)*. 1999;145 (Pt 11):3003-4. PubMed PMID: 10589707.
7. Krasowiak R, Smalla K, Sokolov S, Kosheleva I, Sevastyanovich Y, Titok M, et al. PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids. *FEMS microbiology ecology*. 2002;42(2):217-25. PubMed PMID: 19709281.
8. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*. 2005;63(3):219-28. PubMed PMID: 15935499.
9. Bahl MI, Burmolle M, Meisner A, Hansen LH, Sorensen SJ. All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel epsilon subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid*. 2009;62(2):134-9. PubMed PMID: 19501117.
10. Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in Salmonella. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(2):274-81. PubMed PMID: 19001452.
11. Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(12):2518-29. PubMed PMID: 20935300.
12. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4168-77. PubMed PMID: 20660691.
13. Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid*. 2012. PubMed PMID: 22470007.
14. Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F. Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mob Genet Elements*. 2013;3(1):e24263. doi: 10.4161/mge.24263. PubMed PMID: 23734300; PubMed Central PMCID: PMC3661145.
15. Gerdes K, Moller-Jensen J, Bugge Jensen R. Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology*. 2000;37(3):455-66. PubMed PMID: 10931339.
16. Rose TM. CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Virology journal*. 2005;2:20. PubMed PMID: 15769292.
17. Guglielmini J, de la Cruz F, Rocha EP. Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(2):315-31. doi: 10.1093/molbev/mss221. PubMed PMID: 22977114; PubMed Central PMCID: PMC3548315.
18. Guynet C, de la Cruz F. Plasmid segregation without partition. *Mob Genet Elements*. 2011;1(3):236-41. doi: 10.4161/mge.1.3.18229. PubMed PMID: 22312593; PubMed Central PMCID: PMC3271553.
19. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Extracellular nucleic acids. *Bioessays*. 2007;29(7):654-67. doi: 10.1002/bies.20604. PubMed PMID: 17563084.
20. Skippington E, Ragan MA. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. *FEMS microbiology reviews*. 2011;35(5):707-35. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00261.x. PubMed PMID: 21223321.
21. Brabban AD, Hite E, Callaway TR. Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. *Foodborne Pathog Dis*. 2005;2(4):287-303. doi: 10.1089/fpd.2005.2.287. PubMed PMID: 16366852.

22. Schmieger H, Schicklmaier P. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS microbiology letters*. 1999;170(1):251-6. PubMed PMID: 9919675.
23. Zhang Y, LeJeune JT. Transduction of *bla*(CMY-2), *tet*(A), and *tet*(B) from *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Heidelberg to *S. Typhimurium*. *Vet Microbiol*. 2008;129(3-4):418-25. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.032. PubMed PMID: 18187273.
24. Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS genetics*. 2011;7(8):e1002222. PubMed PMID: 21876676.
25. Beaber JW, Burrus V, Hochhut B, Waldor MK. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(12):2065-70. PubMed PMID: 12568332.
26. Lee CA, Babic A, Grossman AD. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Molecular microbiology*. 2010;75(2):268-79. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06985.x. PubMed PMID: 19943900; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2905045.
27. Norman A, Hansen LH, Sorensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1527):2275-89. doi: 10.1098/rstb.2009.0037. PubMed PMID: 19571247; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2873005.
28. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews*. 2010;8(8):552-63. PubMed PMID: 20601965.
29. Parschat K, Overhage J, Strittmatter AW, Henne A, Gottschalk G, Fetzner S. Complete nucleotide sequence of the 113-kilobase linear catabolic plasmid pAL1 of *Arthrobacter nitroguajacolicus* Ru61a and transcriptional analysis of genes involved in quinaldine degradation. *Journal of bacteriology*. 2007;189(10):3855-67. doi: 10.1128/JB.00089-07. PubMed PMID: 17337569; PubMed Central PMCID: PMCPCMC1913324.
30. Thomas CM. Paradigms of plasmid organization. *Molecular microbiology*. 2000;37(3):485-91. PubMed PMID: 10931342.
31. Boltner D, MacMahon C, Pembroke JT, Strike P, Osborn AM. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *Journal of bacteriology*. 2002;184(18):5158-69. PubMed PMID: 12193633.
32. Toussaint A, Merlin C. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*. 2002;47(1):26-35. doi: 10.1006/plas.2001.1552. PubMed PMID: 11798283.
33. Paulsson J. Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics*. 2002;161(4):1373-84. PubMed PMID: 12238464; PubMed Central PMCID: PMCPCMC1462198.
34. Watve MM, Dahanukar N, Watve MG. Sociobiological control of plasmid copy number in bacteria. *PloS one*. 2010;5(2):e9328. doi: 10.1371/journal.pone.0009328. PubMed PMID: 20195362; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2827543.
35. De Gelder L, Ponciano JM, Joyce P, Top EM. Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology (Reading, England)*. 2007;153(Pt 2):452-63. doi: 10.1099/mic.0.2006/001784-0. PubMed PMID: 17259616.
36. Heuer H, Fox RE, Top EM. Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad-host-range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host. *FEMS microbiology ecology*. 2007;59(3):738-48. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00223.x. PubMed PMID: 17059480.
37. Sota M, Yano H, Hughes JM, Daughdrill GW, Abdo Z, Forney LJ, et al. Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J*. 2010;4(12):1568-80. doi: 10.1038/ismej.2010.72. PubMed PMID: 20520653; PubMed Central PMCID: PMCPCMC3042886.
38. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):434-64. PubMed PMID: 9618448; PubMed Central PMCID: PMCPCMC98921.
39. Benachour A, Frere J, Novel G. pUCL287 plasmid from *Tetragenococcus halophila* (*Pediococcus halophilus*) ATCC 33315 represents a new theta-type replicon family of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology letters*. 1995;128(2):167-75. PubMed PMID: 7750734.
40. Asteri IA, Papadimitriou K, Boutou E, Pot B, Vorgias CE, Tsakalidou E. Comparative and evolutionary analysis of plasmid pREN isolated from *Lactobacillus rennini*, a novel member of the theta-replicating pUCL287 family. *FEMS microbiology letters*. 2011;318(1):18-26. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02232.x. PubMed PMID: 21291494.
41. Das N, Chattoraj DK. Origin pairing ('handcuffing') and unpairing in the control of P1 plasmid replication. *Molecular microbiology*. 2004;54(3):836-49. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04322.x. PubMed PMID: 15491371.

42. Fekete RA, Venkova-Canova T, Park K, Chatteraj DK. IHF-dependent activation of P1 plasmid origin by dnaA. *Molecular microbiology*. 2006;62(6):1739-51. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05479.x. PubMed PMID: 17087773.
43. Rajewska M, Wegrzyn K, Konieczny I. AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS microbiology reviews*. 2012;36(2):408-34. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00300.x. PubMed PMID: 22092310.
44. Chatteraj DK. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Molecular microbiology*. 2000;37(3):467-76. PubMed PMID: 10931340.
45. Gasset-Rosa F, Diaz-Lopez T, Lurz R, Prieto A, Fernandez-Tresguerres ME, Giraldo R. Negative regulation of pPS10 plasmid replication: origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Molecular microbiology*. 2008;68(3):560-72. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06166.x. PubMed PMID: 18284592.
46. del Solar G, Moscoso M, Espinosa M. Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and gram-negative bacteria: a wall falls. *Molecular microbiology*. 1993;8(5):789-96. PubMed PMID: 8355606.
47. Loftie-Eaton W, Rawlings DE. Diversity, biology and evolution of IncQ-family plasmids. *Plasmid*. 2012;67(1):15-34. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.10.001. PubMed PMID: 22037393.
48. Summers DK, Sherratt DJ. Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J*. 1988;7(3):851-8. PubMed PMID: 3294000; PubMed Central PMCID: PMC454402.
49. Hodgman TC, Griffiths H, Summers DK. Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution: a hypothesis. *Molecular microbiology*. 1998;29(2):545-58. PubMed PMID: 9720871.
50. Summers DK, Beton CW, Withers HL. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Molecular microbiology*. 1993;8(6):1031-8. PubMed PMID: 8361350.
51. Koonin EV. A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *Journal of molecular biology*. 1993;229(4):1165-74. doi: 10.1006/jmbi.1993.1115. PubMed PMID: 8445645.
52. Shih YL, Rothfield L. The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(3):729-54. doi: 10.1128/MMBR.00017-06. PubMed PMID: 16959967; PubMed Central PMCID: PMC1594594.
53. Lutkenhaus J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:539-62. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142652. PubMed PMID: 17328675.
54. Larsen RA, Cusumano C, Fujioka A, Lim-Fong G, Patterson P, Pogliano J. Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev*. 2007;21(11):1340-52. doi: 10.1101/gad.1546107. PubMed PMID: 17510284; PubMed Central PMCID: PMC1877747.
55. Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* (New York, NY). 2003;301(5639):1496-9. doi: 10.1126/science.1088157. PubMed PMID: 12970556.
56. Engelberg-Kulka H, Glaser G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol*. 1999;53:43-70. doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.43. PubMed PMID: 10547685.
57. Rawlings DE. Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the *pas* system of pTF-FC2. *FEMS microbiology letters*. 1999;176(2):269-77. PubMed PMID: 10427709.
58. Gerdes K, Jacobsen JS, Franch T. Plasmid stabilization by post-segregational killing. *Genet Eng (N Y)*. 1997;19:49-61. PubMed PMID: 9193102.
59. Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic acids research*. 2005;33(3):966-76. doi: 10.1093/nar/gki201. PubMed PMID: 15718296; PubMed Central PMCID: PMC1549392.
60. Van Melderen L, Saavedra De Bast M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS genetics*. 2009;5(3):e1000437. doi: 10.1371/journal.pgen.1000437. PubMed PMID: 19325885; PubMed Central PMCID: PMC2654758.
61. Lanka E, Barth PT. Plasmid RP4 specifies a deoxyribonucleic acid primase involved in its conjugal transfer and maintenance. *Journal of bacteriology*. 1981;148(3):769-81. PubMed PMID: 6273381; PubMed Central PMCID: PMC216274.
62. Chatfield LK, Orr E, Boulnois GJ, Wilkins BM. DNA primase of plasmid ColIb is involved in conjugal Dna synthesis in donor and recipient bacteria. *Journal of bacteriology*. 1982;152(3):1188-95. PubMed PMID: 6754700; PubMed Central PMCID: PMC221626.

63. Delver EP, Kotova VU, Zavilgelsky GB, Belogurov AA. Nucleotide sequence of the gene (ard) encoding the antirestriction protein of plasmid collb-P9. *Journal of bacteriology*. 1991;173(18):5887-92. PubMed PMID: 1653225; PubMed Central PMCID: PMCPMC208323.
64. Read TD, Thomas AT, Wilkins BM. Evasion of type I and type II DNA restriction systems by IncI1 plasmid ColIb-P9 during transfer by bacterial conjugation. *Molecular microbiology*. 1992;6(14):1933-41. PubMed PMID: 1508042.
65. Bagdasarian M, D'Ari R, Filipowicz W, George J. Suppression of induction of SOS functions in an *Escherichia coli* tif-1 mutant by plasmid R100.1. *Journal of bacteriology*. 1980;141(2):464-9. PubMed PMID: 6444942; PubMed Central PMCID: PMCPMC293648.
66. Bagdasarian M, Bailone A, Angulo JF, Scholz P, Bagdasarian M, Devoret R. PsiB, and anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an *Escherichia coli* K-12 recipient. *Molecular microbiology*. 1992;6(7):885-93. PubMed PMID: 1318487.
67. Petrova V, Chitteni-Pattu S, Drees JC, Inman RB, Cox MM. An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Mol Cell*. 2009;36(1):121-30. doi: 10.1016/j.molcel.2009.07.026. PubMed PMID: 19818715; PubMed Central PMCID: PMCPMC2761248.
68. Golub EI, Low KB. Conjugative plasmids of enteric bacteria from many different incompatibility groups have similar genes for single-stranded DNA-binding proteins. *Journal of bacteriology*. 1985;162(1):235-41. PubMed PMID: 3884590; PubMed Central PMCID: PMCPMC218979.
69. Golub EI, Low KB. Derepression of single-stranded DNA-binding protein genes on plasmids derepressed for conjugation, and complementation of an *E. coli* ssb- mutation by these genes. *Mol Gen Genet*. 1986;204(3):410-6. PubMed PMID: 2945079.
70. Jones AL, Barth PT, Wilkins BM. Zygotic induction of plasmid ssb and psiB genes following conjugative transfer of IncI1 plasmid Collb-P9. *Molecular microbiology*. 1992;6(5):605-13. PubMed PMID: 1552860.
71. Draper O, Cesar CE, Machon C, de la Cruz F, Llosa M. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16385-90. doi: 10.1073/pnas.0506081102. PubMed PMID: 16260740; PubMed Central PMCID: PMCPMC1283433.
72. Garcillan-Barcia MP, Jurado P, Gonzalez-Perez B, Moncalian G, Fernandez LA, de la Cruz F. Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Molecular microbiology*. 2007;63(2):404-16. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05523.x. PubMed PMID: 17163977.
73. Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010;74(3):434-52. PubMed PMID: 20805406.
74. Llosa M, Zunzunegui S, de la Cruz F. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10465-70. PubMed PMID: 12925737.
75. Tato I, Zunzunegui S, de la Cruz F, Cabezon E. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8156-61. doi: 10.1073/pnas.0503402102. PubMed PMID: 15919815; PubMed Central PMCID: PMCPMC1149453.
76. Guglielmini C, Baron Toaldo M, Poser H, Mencioti G, Cipone M, Cordella A, et al. Diagnostic accuracy of the vertebral heart score and other radiographic indices in the detection of cardiac enlargement in cats with different cardiac disorders. *J Feline Med Surg*. 2014;16(10):812-25. doi: 10.1177/1098612X14522048. PubMed PMID: 24518255.
77. Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Molecular microbiology*. 2001;41(2):379-91. PubMed PMID: 11489125.
78. Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular microbiology*. 2005;55(6):1704-21. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x. PubMed PMID: 15752195.
79. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73(4):775-808. doi: 10.1128/MMBR.00023-09. PubMed PMID: 19946141; PubMed Central PMCID: PMCPMC2786583.
80. de la Cruz F, Frost LS, Meyer RJ, Zechner EL. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(1):18-40. PubMed PMID: 19919603.
81. Thompson DV, Melchers LS, Idler KB, Schilperoort RA, Hooykaas PJ. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon. *Nucleic acids research*. 1988;16(10):4621-36. PubMed PMID: 2837739; PubMed Central PMCID: PMCPMC336653.

82. Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science (New York, NY)*. 2009;323(5911):266-8. doi: 10.1126/science.1166101. PubMed PMID: 19131631.
83. Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, et al. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J*. 2013;32(8):1195-204. doi: 10.1038/emboj.2013.58. PubMed PMID: 23511972; PubMed Central PMCID: PMC3630358.
84. Bhatti M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in microbiology*. 2013;164(6):620-39. doi: 10.1016/j.resmic.2013.03.012. PubMed PMID: 23542405; PubMed Central PMCID: PMC3816095.
85. Judd PK, Mahli D, Das A. Molecular characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* DNA transfer protein VirB6. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 11):3483-92. doi: 10.1099/mic.0.28337-0. PubMed PMID: 16272372.
86. Mossey P, Hudacek A, Das A. *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *Journal of bacteriology*. 2010;192(11):2830-8. doi: 10.1128/JB.01331-09. PubMed PMID: 20348257; PubMed Central PMCID: PMC2876495.
87. Kerr JE, Christie PJ. Evidence for VirB4-mediated dislocation of membrane-integrated VirB2 pilin during biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 type IV secretion system. *Journal of bacteriology*. 2010;192(19):4923-34. doi: 10.1128/JB.00557-10. PubMed PMID: 20656905; PubMed Central PMCID: PMC2944537.
88. Berger BR, Christie PJ. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *Journal of bacteriology*. 1994;176(12):3646-60. PubMed PMID: 8206843; PubMed Central PMCID: PMC205554.
89. Bayer M, Iberer R, Bischof K, Rassi E, Stabentheiner E, Zellnig G, et al. Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *Journal of bacteriology*. 2001;183(10):3176-83. doi: 10.1128/JB.183.10.3176-3183.2001. PubMed PMID: 11325947; PubMed Central PMCID: PMC95219.
90. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among *fi* - R factors. *Nature*. 1971;234(5326):222-3. PubMed PMID: 5002028.
91. Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*. 1987;51(4):381-95. PubMed PMID: 3325793.
92. Austin S, Nordstrom K. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell*. 1990;60(3):351-4. PubMed PMID: 2406018.
93. Taylor DG, A; Lawley, TD; Tracz, DM. Antibiotic resistance plasmids. In: Funnell BP, GJ, editor. *Plasmid Biology*. Washington, D.C.: ASM Press; 2004. p. 473-91.
94. Stalker DM, Helinski DR. DNA segments of the IncX plasmid R485 determining replication and incompatibility with plasmid R6K. *Plasmid*. 1985;14(3):245-54. PubMed PMID: 3006104.
95. Lopez J, Crespo P, Rodriguez JC, Andres I, Ortiz JM. Analysis of IncF plasmids evolution: nucleotide sequence of an IncFIII replication region. *Gene*. 1989;78(1):183-7. PubMed PMID: 2767441.
96. Nugent ME. A conjugative 'plasmid' lacking autonomous replication. *Journal of general microbiology*. 1981;126(2):305-10. PubMed PMID: 6279761.
97. Smith CA, Thomas CM. Narrow-host-range IncP plasmid pHH502-1 lacks a complete IncP replication system. *Journal of general microbiology*. 1987;133(8):2247-52. PubMed PMID: 2832520.
98. Kato A, Mizobuchi K. Evolution of the replication regions of IncI alpha and IncFII plasmids by exchanging their replication control systems. *DNA Res*. 1994;1(5):201-12. PubMed PMID: 7584042.
99. Nikolett S, Bird P, Praszkie J, Pittard J. Analysis of the incompatibility determinants of I-complex plasmids. *Journal of bacteriology*. 1988;170(3):1311-8. PubMed PMID: 2449421.
100. Praszkie J, Wei T, Siemering K, Pittard J. Comparative analysis of the replication regions of IncB, IncK, and IncZ plasmids. *Journal of bacteriology*. 1991;173(7):2393-7. PubMed PMID: 1706708.
101. Sesma A, Sundin GW, Murillo J. Closely related plasmid replicons coexisting in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* show a mosaic organization of the replication region and altered incompatibility behavior. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(10):3948-53. PubMed PMID: 9758824.
102. Tietze E. Nucleotide sequence and genetic characterization of the novel IncQ-like plasmid pIE1107. *Plasmid*. 1998;39(3):165-81. PubMed PMID: 9571133.
103. Gardner MN, Rawlings DE. Evolution of compatible replicons of the related IncQ-like plasmids, pTC-F14 and pTF-FC2. *Microbiology (Reading, England)*. 2004;150(Pt 6):1797-808. PubMed PMID: 15184566.
104. Bradley DE. Further characterization of R485, and IncX plasmid that determines two kinds of pilus. *Plasmid*. 1982;7(1):95-100. PubMed PMID: 6124017.

105. Jones CS, Osborne DJ, Stanley J. Molecular comparison of the IncX plasmids allows division into IncX1 and IncX2 subgroups. *Journal of general microbiology*. 1993;139(4):735-41. PubMed PMID: 8390556.
106. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological reviews*. 1988;52(3):375-95. PubMed PMID: 3054468.
107. Heuer H, Binh CT, Jechalke S, Kopmann C, Zimmerling U, Krogerrecklenfort E, et al. IncP-epsilon Plasmids are Important Vectors of Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Systems: Diversification Driven by Class 1 Integron Gene Cassettes. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:2. PubMed PMID: 22279444.
108. Johnson TJ, Nolan LK. Plasmid replicon typing. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ. 2009;551:27-35. PubMed PMID: 19521864.
109. Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;61(6):1229-33. PubMed PMID: 18367460.
110. Phan MD, Kidgell C, Nair S, Holt KE, Turner AK, Hinds J, et al. Variation in *Salmonella enterica* serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):716-27. PubMed PMID: 19015365.
111. Garcia-Fernandez A, Carattoli A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(6):1155-61. PubMed PMID: 20356905.
112. Zong Z, Yu R, Wang X, Lu X. blaCTX-M-65 is carried by a Tn1722-like element on an IncN conjugative plasmid of ST131 *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(Pt 4):435-41. PubMed PMID: 21163826.
113. Guasch A, Lucas M, Moncalian G, Cabezas M, Perez-Luque R, Gomis-Ruth FX, et al. Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nature structural biology*. 2003;10(12):1002-10. PubMed PMID: 14625590.
114. Mata C, Miro E, Alvarado A, Garcillan-Barcia MP, Toleman M, Walsh TR, et al. Plasmid typing and genetic context of AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal ampC genes: findings from a Spanish hospital 1999-2007. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(1):115-22. PubMed PMID: 21980067.
115. Datta S, Larkin C, Schildbach JF. Structural insights into single-stranded DNA binding and cleavage by F factor TraI. *Structure*. 2003;11(11):1369-79. PubMed PMID: 14604527.
116. Monzingo AF, Ozburn A, Xia S, Meyer RJ, Robertus JD. The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *Journal of molecular biology*. 2007;366(1):165-78. PubMed PMID: 17157875.
117. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic acids research*. 1998;26(7):1628-35. PubMed PMID: 9512532.
118. Martinez E, Bartolome B, de la Cruz F. pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene*. 1988;68(1):159-62. PubMed PMID: 2851489.
119. Cabezon E, Sastre JI, de la Cruz F. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol Gen Genet*. 1997;254(4):400-6. PubMed PMID: 9180693.
120. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*. 1991;19(14):4008. PubMed PMID: 1861999.
121. Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods in enzymology*. 1996;266:540-53. PubMed PMID: 8743705.
122. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology*. 1999;292(2):195-202. PubMed PMID: 10493868.
123. Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic acids research*. 2005;33(Web Server issue):W36-8. PubMed PMID: 15980489.
124. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;25(17):3389-402. PubMed PMID: 9254694.
125. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 1994;22(22):4673-80. PubMed PMID: 7984417.

126. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 2007;24(8):1596-9. PubMed PMID: 17488738.
127. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4(4):406-25. PubMed PMID: 3447015.
128. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*. 1985;39(4):783-91.
129. Efron B. The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia. 1982.
130. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.
131. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*. 2006;363(1-2):71-82. doi: 10.1016/j.cccn.2005.06.023. PubMed PMID: 16102740.
132. Dahlberg C, Linberg C, Torsvik VL, Hermansson M. Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Applied and environmental microbiology*. 1997;63(12):4692-7. PubMed PMID: 9406388.
133. Norberg P, Bergstrom M, Jethava V, Dubhashi D, Hermansson M. The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nature communications*. 2011;2:268. doi: 10.1038/ncomms1267. PubMed PMID: 21468020; PubMed Central PMCID: PMC3104523.
134. Bergstrom M, Hermansson M, Dahlberg C. Isolation and sequencing of the replication region of plasmid pBFp1 isolated from a marine biofilm. *Plasmid*. 2004;51(3):179-84. PubMed PMID: 15109824.
135. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(2):195-200. PubMed PMID: 18258110.
136. Pedrosa A, Novais A, Machado E, Canton R, Peixe L, Coque TM. Recent Dissemination of blaTEM-52-producing Enterobacteriaceae in Portugal is caused by spread of IncI1 plasmids among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clones. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Poster presentation Barcelona, Spain. 2008.
137. Novais A, Canton R, Coque TM, Moya A, Baquero F, Galan JC. Mutational events in cefotaximase extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M-1 cluster involved in ceftazidime resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(7):2377-82. PubMed PMID: 18443114.
138. Novais A, Baquero F, Machado E, Canton R, Peixe L, Coque TM. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating enterobacteriaceae clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):825-34. PubMed PMID: 19995930.
139. Oliver A, Coque TM, Alonso D, Valverde A, Baquero F, Canton R. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1567-71. PubMed PMID: 15793141.
140. Novais A, Canton R, Valverde A, Machado E, Galan JC, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of blaCTX-M-9 are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2741-50. PubMed PMID: 16870767.
141. Novais A, Canton R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):796-9. PubMed PMID: 17145793.
142. Valverde A, Canton R, Garcillan-Barcia MP, Novais A, Galan JC, Alvarado A, et al. Spread of bla(CTX-M-14) is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5204-12. PubMed PMID: 19786598.
143. Novais A, Viana D, Baquero F, Canton R, Coque TM. Contemporary spread of CTX-M-14-*Escherichia coli* in Spain is mainly associated with persistent IncK and IncI1 and emerging IncN plasmids. 2010.
144. Valverde A, Canton R, Hawkey P, Pitout J, Nordmann P, Peixe L, et al. International Dissemination of Extended Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-14 in Enterobacteriaceae isolates is mainly associated with the spread of IncK and IncF plasmids. *CMI*. 2009;15(Suppl 4):2.
145. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology*. 1981;145(3):1365-73. PubMed PMID: 7009583.

146. Ruiz del Castillo B, Vinue L, Roman EJ, Guerra B, Carattoli A, Torres C, et al. Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum beta-lactamases. *BMC Microbiol.* 2013;13:84. doi: 10.1186/1471-2180-13-84. PubMed PMID: 23586437; PubMed Central PMCID: PMC3637601.
147. Ejrnaes K, Stegger M, Reisner A, Ferry S, Monsen T, Holm SE, et al. Characteristics of *Escherichia coli* causing persistence or relapse of urinary tract infections: phylogenetic groups, virulence factors and biofilm formation. *Virulence.* 2006;2(6):528-37. PubMed PMID: 22030858.
148. Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):903-8. PubMed PMID: 14982782; PubMed Central PMCID: PMC353138.
149. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38. PubMed PMID: 19307361.
150. Brown CJ, Sen D, Yano H, Bauer ML, Rogers LM, Van der Auwera GA, et al. Diverse broad-host-range plasmids from freshwater carry few accessory genes. *Applied and environmental microbiology.* 2013;79(24):7684-95. doi: 10.1128/AEM.02252-13. PubMed PMID: 24096417; PubMed Central PMCID: PMC3837812.
151. Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, et al. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC genomics.* 2009;10:616. PubMed PMID: 20017926.
152. Bramucci M, Chen M, Nagarajan V. Genetic organization of a plasmid from an industrial wastewater bioreactor. *Applied microbiology and biotechnology.* 2006;71(1):67-74. doi: 10.1007/s00253-005-0119-2. PubMed PMID: 16244860.
153. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of bla_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5403-7. doi: 10.1128/AAC.00585-11. PubMed PMID: 21859933; PubMed Central PMCID: PMC3195013.
154. da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature.* 2002;417(6887):459-63. doi: 10.1038/417459a. PubMed PMID: 12024217.
155. Thieme F, Koebnik R, Bekel T, Berger C, Boch J, Buttner D, et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of bacteriology.* 2005;187(21):7254-66. doi: 10.1128/JB.187.21.7254-7266.2005. PubMed PMID: 16237009; PubMed Central PMCID: PMC1272972.
156. El Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW. In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Applied and environmental microbiology.* 2007;73(5):1612-21. PubMed PMID: 17220258.
157. Sundin GW. Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annu Rev Phytopathol.* 2007;45:129-51. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094317. PubMed PMID: 17367270.
158. Remenant B, de Cambiaire JC, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S, Barbe V, et al. *Ralstonia solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PloS one.* 2011;6(9):e24356. doi: 10.1371/journal.pone.0024356. PubMed PMID: 21931687; PubMed Central PMCID: PMC3169583.
159. Alegria MC, Souza DP, Andrade MO, Docena C, Khater L, Ramos CH, et al. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of bacteriology.* 2005;187(7):2315-25. doi: 10.1128/JB.187.7.2315-2325.2005. PubMed PMID: 15774874; PubMed Central PMCID: PMC1065226.
160. Dennis JJ, Zylstra GJ. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *Journal of molecular biology.* 2004;341(3):753-68. doi: 10.1016/j.jmb.2004.06.034. PubMed PMID: 15288784.
161. Sevastyanovich YR, Titok MA, Krasowiak R, Bingle LE, Thomas CM. Ability of IncP-9 plasmid pM3 to replicate in *Escherichia coli* is dependent on both rep and par functions. *Molecular microbiology.* 2005;57(3):819-33. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04732.x. PubMed PMID: 16045624.
162. Jussila MM, Zhao J, Suominen L, Lindstrom K. TOL plasmid transfer during bacterial conjugation in vitro and rhizoremediation of oil compounds in vivo. *Environ Pollut.* 2007;146(2):510-24. doi: 10.1016/j.envpol.2006.07.012. PubMed PMID: 17000041.
163. Sevastyanovich YR, Krasowiak R, Bingle LE, Haines AS, Sokolov SL, Kosheleva IA, et al. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*. *Microbiology (Reading, England).* 2008;154(Pt 10):2929-41. PubMed PMID: 18832300.

164. Dennis JJ. The evolution of IncP catabolic plasmids. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(3):291-8. doi: 10.1016/j.copbio.2005.04.002. PubMed PMID: 15961030.
165. Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Applied and environmental microbiology.* 2007;73(6):1976-83. PubMed PMID: 17277222.
166. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(4):750-74. PubMed PMID: 19946140.
167. Heidemann Olsen R, Christensen H, Bisgaard M. Comparative genomics of multiple plasmids from APEC associated with clonal outbreaks demonstrates major similarities and identifies several potential vaccine-targets. *Veterinary Microbiology.* 2012;in press.
168. Ma J, Liu JH, Lv L, Zong Z, Sun Y, Zheng H, et al. Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes Found among *Escherichia coli* Isolates from Duck and Environmental Samples Obtained on a Duck Farm. *Applied and environmental microbiology.* 2012;78(10):3668-73. PubMed PMID: 22407683.
169. Garcia-Fernandez A, Villa L, Moodley A, Hasman H, Miriagou V, Guardabassi L, et al. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2011;66(9):1987-91. PubMed PMID: 21653604.
170. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol.* 2006;112(1):1-10. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.030. PubMed PMID: 16303262.
171. Shepard SM, Danzeisen JL, Isaacson RE, Seemann T, Achtman M, Johnson TJ. Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology.* 2012;194(2):395-405. PubMed PMID: 22081385.
172. Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, et al. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC genomics.* 2008;9:427. PubMed PMID: 18801193.
173. Brankatschk K, Blom J, Goesmann A, Smits TH, Duffy B. Comparative genomic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Weltevreden foodborne strains with other serovars. *Int J Food Microbiol.* 2012;155(3):247-56. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.024. PubMed PMID: 22341936.
174. Karunasagar I, Sugumar G, Karunasagar I, Reilley A. Rapid detection of *Vibrio cholerae* contamination of seafood by polymerase chain reaction. *Molecular marine biology and biotechnology.* 1995;4(4):365-8. PubMed PMID: 8541985.
175. Lee CT, Amaro C, Wu KM, Valiente E, Chang YF, Tsai SF, et al. A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid. *Journal of bacteriology.* 2008;190(5):1638-48. PubMed PMID: 18156267.
176. Hjerde E, Lorentzen MS, Holden MT, Seeger K, Paulsen S, Bason N, et al. The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. *BMC genomics.* 2008;9:616. PubMed PMID: 19099551.
177. Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and immunity.* 2009;77(5):1723-33. PubMed PMID: 19255188.
178. Erauso G, Lakhal F, Bidault-Toffin A, Le Chevalier P, Bouloc P, Paillard C, et al. Evidence for the role of horizontal transfer in generating pVT1, a large mosaic conjugative plasmid from the clam pathogen, *Vibrio tapetis*. *PloS one.* 2011;6(2):e16759. PubMed PMID: 21326607.
179. Ziegelin G, Pansegrau W, Strack B, Balzer D, Kroger M, Kruff V, et al. Nucleotide sequence and organization of genes flanking the transfer origin of promiscuous plasmid RP4. *DNA Seq.* 1991;1(5):303-27. PubMed PMID: 1665997.
180. Ziegelin G, Pansegrau W, Lurz R, Lanka E. TraK protein of conjugative plasmid RP4 forms a specialized nucleoprotein complex with the transfer origin. *The Journal of biological chemistry.* 1992;267(24):17279-86. PubMed PMID: 1324929.
181. Thomas CM. Molecular genetics of broad host range plasmid RK2. *Plasmid.* 1981;5(1):10-9. PubMed PMID: 6164066.
182. Jobanputra RS, Datta N. Trimethoprim R factors in enterobacteria from clinical specimens. *Journal of medical microbiology.* 1974;7(2):169-77. doi: 10.1099/00222615-7-2-169. PubMed PMID: 4599661.
183. Thorsted PB, Macartney DP, Akhtar P, Haines AS, Ali N, Davidson P, et al. Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *Journal of molecular biology.* 1998;282(5):969-90. PubMed PMID: 9753548.
184. Vedler E, Vahter M, Heinaru A. The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *Journal of bacteriology.* 2004;186(21):7161-74. PubMed PMID: 15489427.

185. Oliveira CS, Lazaro B, Azevedo JS, Henriques I, Almeida A, Correia A. New molecular variants of epsilon and beta IncP-1 plasmids are present in estuarine waters. *Plasmid*. 2012;67(3):252-8. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.11.002. PubMed PMID: 22107909.
186. Haines AS, Akhtar P, Stephens ER, Jones K, Thomas CM, Perkins CD, et al. Plasmids from freshwater environments capable of IncQ retrotransfer are diverse and include pQKH54, a new IncP-1 subgroup archetype. *Microbiology (Reading, England)*. 2006;152(Pt 9):2689-701. PubMed PMID: 16946264.
187. Schluter A, Szczepanowski R, Kurz N, Schneiker S, Krahn I, Puhler A. Erythromycin resistance-conferring plasmid pRSB105, isolated from a sewage treatment plant, harbors a new macrolide resistance determinant, an integron-containing Tn402-like element, and a large region of unknown function. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(6):1952-60. PubMed PMID: 17261525.
188. Adamczyk M, Jagura-Burdzy G. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta biochimica Polonica*. 2003;50(2):425-53. PubMed PMID: 12833168.
189. Sen D, Van der Auwera GA, Rogers LM, Thomas CM, Brown CJ, Top EM. Broad-host-range plasmids from agricultural soils have IncP-1 backbones with diverse accessory genes. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(22):7975-83. doi: 10.1128/AEM.05439-11. PubMed PMID: 21948829; PubMed Central PMCID: PMC3209000.
190. Tschape H, Tietze E. Characterization of conjugative plasmids belonging to a new incompatibility group (IncZ). *Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie*. 1983;23(6):393-401. PubMed PMID: 6356640.
191. Praszker J, Pittard AJ. Control of replication in I-complex plasmids. *Plasmid*. 2005;53(2):97-112. PubMed PMID: 15737397.
192. Yi H, Cho YJ, Hur HG, Chun J. Genome sequence of *Escherichia coli* AA86, isolated from cow feces. *Journal of bacteriology*. 2011;193(14):3681. PubMed PMID: 21602332.
193. Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, et al. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic acids research*. 2005;33(5):1690-8. doi: 10.1093/nar/gki297. PubMed PMID: 15781495; PubMed Central PMCID: PMC1069006.
194. Froehlich B, Parkhill J, Sanders M, Quail MA, Scott JR. The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *Journal of bacteriology*. 2005;187(18):6509-16. doi: 10.1128/JB.187.18.6509-6516.2005. PubMed PMID: 16159784; PubMed Central PMCID: PMC1236633.
195. Curiao T, Canton R, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. Association of composite IS26-sul3 elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2451-7. doi: 10.1128/AAC.01448-10. PubMed PMID: 21343460; PubMed Central PMCID: PMC3088239.
196. Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS, Kotsakis SD, Tzelepi E, Miriagou V. Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(1):376-81. PubMed PMID: 20956594.
197. Sorum H, L'Abée-Lund TM, Solberg A, Wold A. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(4):1285-90. PubMed PMID: 12654659; PubMed Central PMCID: PMC152485.
198. Haines AS, Jones K, Cheung M, Thomas CM. The IncP-6 plasmid Rms149 consists of a small mobilizable backbone with multiple large insertions. *Journal of bacteriology*. 2005;187(14):4728-38. PubMed PMID: 15995187.
199. Nunez B, Avila P, de la Cruz F. Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K. *Molecular microbiology*. 1997;24(6):1157-68. PubMed PMID: 9218765.
200. Norman A, Hansen LH, She Q, Sorensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*. 2008;60(1):59-74. PubMed PMID: 18440636.
201. Chu C, Feng Y, Chien AC, Hu S, Chu CH, Chiu CH. Evolution of genes on the *Salmonella* Virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. *Genomics*. 2008;92(5):339-43. PubMed PMID: 18718522.
202. Richardson EJ, Limaye B, Inamdar H, Datta A, Manjari KS, Pullinger GD, et al. Genome sequences of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. *Journal of bacteriology*. 2011;193(12):3162-3. PubMed PMID: 21478351.
203. Partridge SR, Ellem JA, Tetu SG, Zong Z, Paulsen IT, Iredell JR. Complete sequence of pJIE143, a pir-type plasmid carrying ISEcp1-blaCTX-M-15 from an *Escherichia coli* ST131 isolate. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2011;55(12):5933-5. doi: 10.1128/AAC.00639-11. PubMed PMID: 21911569; PubMed Central PMCID: PMC3232798.
204. Eppinger M, Radnedge L, Andersen G, Vietri N, Severson G, Mou S, et al. Novel Plasmids and Resistance Phenotypes in *Yersinia pestis*: Unique Plasmid Inventory of Strain Java 9 Mediates High Levels of Arsenic Resistance. *PloS one*. 2012;7(3):e32911. PubMed PMID: 22479347.
205. Kulinska A, Czeredys M, Hayes F, Jagura-Burdzy G. Genomic and functional characterization of the modular broad-host-range RA3 plasmid, the archetype of the IncU group. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(13):4119-32. PubMed PMID: 18502921.
206. Rhodes G, Parkhill J, Bird C, Ambrose K, Jones MC, Huys G, et al. Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(12):7497-510. PubMed PMID: 15574953.
207. Finnegan J, Sherratt D. Plasmid ColE1 conjugal mobility: the nature of bom, a region required in cis for transfer. *Mol Gen Genet*. 1982;185(2):344-51. PubMed PMID: 7045589.
208. Varsaki A, Lucas M, Afendra AS, Drainas C, de la Cruz F. Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Molecular microbiology*. 2003;48(2):481-93. PubMed PMID: 12675806.
209. Chen CY, Lindsey RL, Strobaugh TP, Jr., Frye JG, Meinersmann RJ. Prevalence of ColE1-like plasmids and kanamycin resistance genes in *Salmonella enterica* serovars. *Applied and environmental microbiology*. 2010;76(20):6707-14. PubMed PMID: 20693446.
210. Chen CY, Strobaugh TP, Jr., Frye JG. Characterization of small ColE1-like plasmids conferring kanamycin resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. *Plasmid*. 2010;63(3):150-4. PubMed PMID: 20100512.
211. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1212-7. PubMed PMID: 11959547.
212. Zioga A, Whichard JM, Kotsakis SD, Tzouveleki LS, Tzelepi E, Miriagou V. CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(3):1256-9. PubMed PMID: 19104021.
213. Naderer M, Brust JR, Knowle D, Blumenthal RM. Mobility of a restriction-modification system revealed by its genetic contexts in three hosts. *Journal of bacteriology*. 2002;184(9):2411-9. PubMed PMID: 11948154; PubMed Central PMCID: PMC3232798.
214. Kehrenberg C, Schwarz S. Plasmid-borne florfenicol resistance in *Pasteurella multocida*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;55(5):773-5. doi: 10.1093/jac/dki102. PubMed PMID: 15814600.
215. Blanco M, Gutierrez-Martin CB, Rodriguez-Ferri EF, Roberts MC, Navas J. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(2):702-8. PubMed PMID: 16436729.
216. Matter D, Rossano A, Sieber S, Perreten V. Small multidrug resistance plasmids in *Actinobacillus porciconsillarum*. *Plasmid*. 2008;59(2):144-52. doi: 10.1016/j.plasmid.2007.11.003. PubMed PMID: 18190962.
217. Blanco M, Kadlec K, Gutierrez Martin CB, de la Fuente AJ, Schwarz S, Navas J. Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene tet(H). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(4):864-7. PubMed PMID: 17704116.
218. Boyd J, Williams J, Curtis B, Kozera C, Singh R, Reith M. Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. *Plasmid*. 2003;50(2):131-44. PubMed PMID: 12932739.
219. Fehr D, Casanova C, Liverman A, Blazkova H, Orth K, Dobbelaere D, et al. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology (Reading, England)*. 2006;152(Pt 9):2809-18. doi: 10.1099/mic.0.28889-0. PubMed PMID: 16946275.
220. Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, Ashman K, Bagdasarian M, Scherzinger E. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*. 1989;75(2):271-88. PubMed PMID: 2653965.
221. Smalla K, Heuer H, Gotz A, Niemeyer D, Krogerrecklenfort E, Tietze E. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(11):4854-62. PubMed PMID: 11055935.
222. You XY, Guo X, Zheng HJ, Zhang MJ, Liu LJ, Zhu YQ, et al. Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation. *J Genet Genomics*. 2011;38(6):243-52. doi: 10.1016/j.jgg.2011.04.006. PubMed PMID: 21703548.

223. van Zyl LJ, Deane SM, Louw LA, Rawlings DE. Presence of a family of plasmids (29 to 65 kilobases) with a 26-kilobase common region in different strains of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(14):4300-8. PubMed PMID: 18515486.
224. Bernardi A, Bernardi F. Complete sequence of pSC101. *Nucleic acids research*. 1984;12(24):9415-26. PubMed PMID: 6096829; PubMed Central PMCID: PMCPMC320470.
225. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):603-8. doi: 10.1128/AAC.00997-08. PubMed PMID: 19029321; PubMed Central PMCID: PMCPMC2630628.
226. Jandle S, Meyer R. Stringent and relaxed recognition of oriT by related systems for plasmid mobilization: implications for horizontal gene transfer. *Journal of bacteriology*. 2006;188(2):499-506. PubMed PMID: 16385040.
227. Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park SH, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res*. 2008;15(6):375-86. PubMed PMID: 18931093.
228. Zaleski P, Wolinowska R, Strzezek K, Lakomy A, Plucienniczak A. The complete sequence and segregational stability analysis of a new cryptic plasmid pIGWZ12 from a clinical strain of *Escherichia coli*. *Plasmid*. 2006;56(3):228-32. PubMed PMID: 16828160.
229. Fricke WF, Wright MS, Lindell AH, Harkins DM, Baker-Austin C, Ravel J, et al. Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *Journal of bacteriology*. 2008;190(20):6779-94. doi: 10.1128/JB.00661-08. PubMed PMID: 18708504; PubMed Central PMCID: PMCPMC2566207.
230. Chak KF, James R. Characterization of the ColE9-J plasmid and analysis of its genetic organization. *Journal of general microbiology*. 1986;132(1):61-70. doi: 10.1099/00221287-132-1-61. PubMed PMID: 3011960.
231. Burrus V, Marrero J, Waldor MK. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid*. 2006;55(3):173-83. doi: 10.1016/j.plasmid.2006.01.001. PubMed PMID: 16530834.
232. Murata T, Ohnishi M, Ara T, Kaneko J, Han CG, Li YF, et al. Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1: implications for evolution of large plasmid genomes. *Journal of bacteriology*. 2002;184(12):3194-202. PubMed PMID: 12029035.
233. Koch WH, Fernandez de Henestrosa AR, Woodgate R. Identification of mucAB-like homologs on two IncT plasmids, R394 and Rts-1. *Mutation research*. 2000;457(1-2):1-13. PubMed PMID: 11106794.
234. Hauman JH, Hedges RW, Coetzee WF, Coetzee JN. Plasmid R394 is a cointegrate. *Journal of general microbiology*. 1982;128(11):2791-5. PubMed PMID: 6759617.
235. Villa L, Carattoli A, Nordmann P, Carta C, Poirel L. Complete sequence of the IncT-type plasmid pT-OXA-181 carrying the blaOXA-181 carbapenemase gene from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(4):1965-7. doi: 10.1128/AAC.01297-12. PubMed PMID: 23357767; PubMed Central PMCID: PMCPMC3623325.
236. Harada S, Ishii Y, Saga T, Kouyama Y, Tateda K, Yamaguchi K. Chromosomal integration and location on IncT plasmids of the blaCTX-M-2 gene in *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(2):1093-6. doi: 10.1128/AAC.00258-11. PubMed PMID: 22106217; PubMed Central PMCID: PMCPMC3264238.
237. Yano H, Miyakoshi M, Ohshima K, Tabata M, Nagata Y, Hattori M, et al. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *Journal of bacteriology*. 2010;192(17):4337-47. PubMed PMID: 20581207.
238. Maeda K, Nojiri H, Shintani M, Yoshida T, Habe H, Omori T. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *Journal of molecular biology*. 2003;326(1):21-33. PubMed PMID: 12547188.
239. Takahashi Y, Shintani M, Yamane H, Nojiri H. The complete nucleotide sequence of pCAR2: pCAR2 and pCAR1 were structurally identical IncP-7 carbazole degradative plasmids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009;73(3):744-6. PubMed PMID: 19270415.
240. Shintani M, Habe H, Tsuda M, Omori T, Yamane H, Nojiri H. Recipient range of IncP-7 conjugative plasmid pCAR2 from *Pseudomonas putida* HS01 is broader than from other *Pseudomonas* strains. *Biotechnology letters*. 2005;27(23-24):1847-53. PubMed PMID: 16328978.
241. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, et al. blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage

- of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):590-6. doi: 10.1128/AAC.00055-09. PubMed PMID: 19949054; PubMed Central PMCID: PMC2812137.
242. Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ. Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Applied and environmental microbiology.* 2009;75(7):1908-15. doi: 10.1128/AEM.02228-08. PubMed PMID: 19181840; PubMed Central PMCID: PMC2663206.
243. Burrus V, Waldor MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in microbiology.* 2004;155(5):376-86. doi: 10.1016/j.resmic.2004.01.012. PubMed PMID: 15207870.
244. Coetzee JN, Datta N, Hedges RW. R factors from *Proteus rettgeri*. *Journal of general microbiology.* 1972;72(3):543-52. PubMed PMID: 4564689.
245. Ramirez-Diaz MI, Diaz-Magana A, Meza-Carmen V, Johnstone L, Cervantes C, Rensing C. Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid.* 2011;66(1):7-18. PubMed PMID: 21421005.
246. Klockgether J, Wurdemann D, Reva O, Wiehlmann L, Tummler B. Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology.* 2007;189(6):2443-59. PubMed PMID: 17194795.
247. Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tummler B. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *Journal of bacteriology.* 2004;186(2):518-34. PubMed PMID: 14702321.
248. Caro-Quintero A, Auchtung J, Deng J, Brettar I, Hofle M, Tiedje JM, et al. Genome sequencing of five *Shewanella baltica* strains recovered from the oxic-anoxic interface of the Baltic Sea. *Journal of bacteriology.* 2012;194(5):1236. PubMed PMID: 22328742.
249. Aravind L, Koonin EV. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in biochemical sciences.* 1998;23(12):469-72. PubMed PMID: 9868367.
250. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1998-2004. PubMed PMID: 19258268.
251. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2143-5. doi: 10.1128/AAC.05308-11. PubMed PMID: 22252815; PubMed Central PMCID: PMC3318348.
252. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding aac(6)-Ib. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2012;67(4):898-901. doi: 10.1093/jac/dkr552. PubMed PMID: 22287232.
253. Núñez BdlC, F. Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Molecular microbiology.* 2001;39(4):12.
254. Fricke WF, Mammel MK, McDermott PF, Tartera C, White DG, Leclerc JE, et al. Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. *Journal of bacteriology.* 2011;193(14):3556-68. doi: 10.1128/JB.00297-11. PubMed PMID: 21602358; PubMed Central PMCID: PMC3133335.
255. Strauch E, Goelz G, Knabner D, Konietzny A, Lanka E, Appel B. A cryptic plasmid of *Yersinia enterocolitica* encodes a conjugative transfer system related to the regions of CloDF13 Mob and IncX Pil. *Microbiology (Reading, England).* 2003;149(Pt 10):2829-45. PubMed PMID: 14523116.
256. Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, Rasko DA, Kokorina G, Fayolle C, et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS genetics.* 2007;3(8):e142. PubMed PMID: 17784789.
257. Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(38):13826-31. doi: 10.1073/pnas.0404012101. PubMed PMID: 15358858; PubMed Central PMCID: PMC518763.
258. Schubert S, Dufke S, Sorsa J, Heesemann J. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Molecular microbiology.* 2004;51(3):837-48. PubMed PMID: 14731283.
259. Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, Tsai SF, Wang JT. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *Journal of bacteriology.* 2008;190(2):515-26. PubMed PMID: 17981959.

260. Putze J, Hennequin C, Nougayrede JP, Zhang W, Homburg S, Karch H, et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infection and immunity*. 2009;77(11):4696-703. PubMed PMID: 19720753.
261. Kucerova E, Clifton SW, Xia XQ, Long F, Porwollik S, Fulton L, et al. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PloS one*. 2010;5(3):e9556. PubMed PMID: 20221447.
262. Stephan R, Lehner A, Tischler P, Rattei T. Complete genome sequence of *Cronobacter turicensis* LMG 23827, a food-borne pathogen causing deaths in neonates. *Journal of bacteriology*. 2011;193(1):309-10. PubMed PMID: 21037008.
263. Franco AA, Hu L, Grim CJ, Gopinath G, Sathyamoorthy V, Jarvis KG, et al. Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by *Cronobacter* spp. *Applied and environmental microbiology*. 2011;77(10):3255-67. PubMed PMID: 21421789.
264. Wilkinson P, Paszkiewicz K, Moorhouse A, Szubert JM, Beatson S, Gerrard J, et al. New plasmids and putative virulence factors from the draft genome of an Australian clinical isolate of *Photobacterium asymbiotica*. *FEMS microbiology letters*. 2010;309(2):136-43. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02030.x. PubMed PMID: 20584081.
265. Soler Bistue AJ, Birshan D, Tomaras AP, Dandekar M, Tran T, Newmark J, et al. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements. *PloS one*. 2008;3(3):e1800. doi: 10.1371/journal.pone.0001800. PubMed PMID: 18350140; PubMed Central PMCID: PMCPMC2262945.
266. Hazen TH, Wu D, Eisen JA, Sobecky PA. Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(23):7703-10. doi: 10.1128/AEM.01577-07. PubMed PMID: 17921277; PubMed Central PMCID: PMCPMC2168046.
267. Francia MV, Clewell DB, de la Cruz F, Moncalian G. Catalytic domain of plasmid pAD1 relaxase TraX defines a group of relaxases related to restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(33):13606-11. doi: 10.1073/pnas.1310037110. PubMed PMID: 23904483; PubMed Central PMCID: PMCPMC3746933.
268. Harada KM, Aso Y, Hashimoto W, Mikami B, Murata K. Sequence and analysis of the 46.6-kb plasmid pA1 from *Sphingomonas* sp. A1 that corresponds to the typical IncP-1beta plasmid backbone without any accessory gene. *Plasmid*. 2006;56(1):11-23. PubMed PMID: 16445980.
269. Garcillan-Barcia MP, Ruiz del Castillo B, Alvarado A, de la Cruz F, Martinez-Martinez L. Degenerate primer MOB typing of multiresistant clinical isolates of *E. coli* uncovers new plasmid backbones. *Plasmid*. 2015;77:17-27. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.11.003. PubMed PMID: 25463772.
270. Krol JE, Penrod JT, McCaslin H, Rogers LM, Yano H, Stancik AD, et al. Role of IncP-1beta plasmids pWDL7::rfp and pNB8c in chloroaniline catabolism as determined by genomic and functional analyses. *Applied and environmental microbiology*. 2012;78(3):828-38. PubMed PMID: 22101050.
271. Johnson TJ, Johnson SJ, Nolan LK. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *Journal of bacteriology*. 2006;188(16):5975-83. PubMed PMID: 16885466.
272. Ye C, Lan R, Xia S, Zhang J, Sun Q, Zhang S, et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(2):419-26. PubMed PMID: 19955273.
273. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6):685-707. doi: 10.1007/s00018-004-4513-1. PubMed PMID: 15770420.
274. Smet A, Van Nieuwerburgh F, Vandekerckhove TT, Martel A, Deforce D, Butaye P, et al. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PloS one*. 2010;5(6):e11202. PubMed PMID: 20585456.
275. Ponting CP. Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic acids research*. 2002;30(17):3643-52. PubMed PMID: 12202748.
276. Pham P, Bertram JG, O'Donnell M, Woodgate R, Goodman MF. A model for SOS-lesion-targeted mutations in *Escherichia coli*. *Nature*. 2001;409(6818):366-70. doi: 10.1038/35053116. PubMed PMID: 11201748.
277. Schlacher K, Cox MM, Woodgate R, Goodman MF. RecA acts in trans to allow replication of damaged DNA by DNA polymerase V. *Nature*. 2006;442(7105):883-7. doi: 10.1038/nature05042. PubMed PMID: 16929290.
278. Cesareni G, Muesing MA, Polisky B. Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America. 1982;79(20):6313-7. PubMed PMID: 6183660; PubMed Central PMCID: PMC347111.
279. Varsaki A, Moncalian G, Garcillan-Barcia Mdel P, Drainas C, de la Cruz F. Analysis of ColE1 MbeC unveils an extended ribbon-helix-helix family of nicking accessory proteins. *Journal of bacteriology*. 2009;191(5):1446-55. doi: 10.1128/JB.01342-08. PubMed PMID: 19114496; PubMed Central PMCID: PMC32648203.
280. Busby S, Ebright RH. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *Journal of molecular biology*. 1999;293(2):199-213. doi: 10.1006/jmbi.1999.3161. PubMed PMID: 10550204.
281. Pothier JF, Vorholter FJ, Blom J, Goesmann A, Puhler A, Smits TH, et al. The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. *FEMS microbiology letters*. 2011;323(1):52-60. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02352.x. PubMed PMID: 21732961.
282. Komano T, Fujitani S, Funayama N, Kanno A, Sakuma K. Physical and genetic analyses of IncI2 plasmid R721: evidence for the presence of shufflon. *Plasmid*. 1990;23(3):248-51. PubMed PMID: 2217575.
283. Schroder G, Lanka E. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid*. 2005;54(1):1-25. doi: 10.1016/j.plasmid.2005.02.001. PubMed PMID: 15907535.
284. Yeo HJ, Yuan Q, Beck MR, Baron C, Waksman G. Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(26):15947-52. doi: 10.1073/pnas.2535211100. PubMed PMID: 14673074; PubMed Central PMCID: PMC307673.
285. Waksman G, Fronzes R. Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(12):691-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.06.002. PubMed PMID: 20621482.
286. Zechner EL, Lang S, Schildbach JF. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1592):1073-87. doi: 10.1098/rstb.2011.0207. PubMed PMID: 22411979; PubMed Central PMCID: PMC3297438.
287. Fernandez-Lopez R, Garcillan-Barcia MP, Revilla C, Lazaro M, Vielva L, de la Cruz F. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(6):942-66. PubMed PMID: 17026718.
288. Hayes F. A family of stability determinants in pathogenic bacteria. *Journal of bacteriology*. 1998;180(23):6415-8. PubMed PMID: 9829958.
289. Magnuson RD. Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. *Journal of bacteriology*. 2007;189(17):6089-92. doi: 10.1128/JB.00958-07. PubMed PMID: 17616596; PubMed Central PMCID: PMC1951896.
290. Bielak E, Bergenholtz RD, Jorgensen MS, Sorensen SJ, Hansen LH, Hasman H. Investigation of diversity of plasmids carrying the blaTEM-52 gene. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(11):2465-74. doi: 10.1093/jac/dkr331. PubMed PMID: 21831988.
291. Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(11):3014-20. doi: 10.1128/AAC.45.11.3014-3020.2001. PubMed PMID: 11600350; PubMed Central PMCID: PMC307676.
292. Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, et al. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):269-76. doi: 10.1128/AAC.01648-12. PubMed PMID: 23114770; PubMed Central PMCID: PMC3535970.
293. Eikmeyer F, Hadiati A, Szczepanowski R, Wibberg D, Schneiker-Bekel S, Rogers LM, et al. The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid*. 2012;68(1):13-24. PubMed PMID: 22326849.
294. Bukowski M, Rojowska A, Wladyka B. Prokaryotic toxin-antitoxin systems--the role in bacterial physiology and application in molecular biology. *Acta biochimica Polonica*. 2011;58(1):1-9. PubMed PMID: 21394325.
295. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, et al. Complete sequencing of the bla(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PloS one*. 2011;6(9):e25334. PubMed PMID: 21966500.
296. Boot M, Raadsen S, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls C. Rapid plasmid replicon typing by real time PCR melting curve analysis. *BMC Microbiol*. 2013;13:83. doi: 10.1186/1471-2180-13-83. PubMed PMID: 23586392; PubMed Central PMCID: PMC3639092.

297. Sobecky PA, Mincer TJ, Chang MC, Helinski DR. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and environmental microbiology*. 1997;63(3):888-95. PubMed PMID: 9055407.
298. Sobecky PA, Mincer TJ, Chang MC, Toukdarian A, Helinski DR. Isolation of broad-host-range replicons from marine sediment bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(8):2822-30. PubMed PMID: 9687436.
299. van Elsas JD, Gardener BB, Wolters AC, Smit E. Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*. 1998;64(3):880-9. PubMed PMID: 9501428.
300. Gstalter ME, Faalen M, Mine N, Top EM, Mergeay M, Couturier M. Replication functions of new broad host range plasmids isolated from polluted soils. *Research in microbiology*. 2003;154(7):499-509. PubMed PMID: 14499936.
301. Elhani D, Bakir L, Aouni M, Passet V, Arlet G, Brisse S, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999-2005. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(2):157-64. PubMed PMID: 19769601.
302. Sirichote P, Hasman H, Pulsrikarn C, Schonheyder HC, Samulioniene J, Pornruangmong S, et al. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* isolates from patients in Thailand and Denmark. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(3):883-8. PubMed PMID: 20032253.
303. Malik A, Celik EK, Bohn C, Bockelmann U, Knobel K, Grohmann E. Detection of conjugative plasmids and antibiotic resistance genes in anthropogenic soils from Germany and India. *FEMS microbiology letters*. 2008;279(2):207-16. PubMed PMID: 18179584.
304. Diestra K, Juan C, Curiao T, Moya B, Miro E, Oteo J, et al. Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(1):60-6. PubMed PMID: 18988679.
305. Marcade G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(1):67-71. PubMed PMID: 18931389.
306. Van der Auwera GA, Krol JE, Suzuki H, Foster B, Van Houdt R, Brown CJ, et al. Plasmids captured in *C. metallidurans* CH34: defining the PromA family of broad-host-range plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009;96(2):193-204. PubMed PMID: 19259779.
307. Wintjens R, Rooman M. Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *Journal of molecular biology*. 1996;262(2):294-313. doi: 10.1006/jmbi.1996.0514. PubMed PMID: 8831795.
308. Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miro E, et al. ESBL- and plasmidic class C beta-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol*. 2006;118(3-4):299-304. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.002. PubMed PMID: 16973308.
309. Costa D, Vinue L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Saenz Y, et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol*. 2009;138(3-4):339-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.029. PubMed PMID: 19372011.
310. Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, et al. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1511-6. doi: 10.1007/s10096-011-1471-z. PubMed PMID: 22065280.
311. Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, et al. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(1):86-95. doi: 10.1093/jac/dkq396. PubMed PMID: 21098542.
312. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6-7):298-304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001. PubMed PMID: 23499304.
313. Moreno Switt AI, den Bakker HC, Cummings CA, Rodriguez-Rivera LD, Govoni G, Raneiri ML, et al. Identification and characterization of novel *Salmonella mobile* elements involved in the dissemination of genes linked to virulence and transmission. *PloS one*. 2012;7(7):e41247. doi: 10.1371/journal.pone.0041247. PubMed PMID: 22911766; PubMed Central PMCID: PMC3401170.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

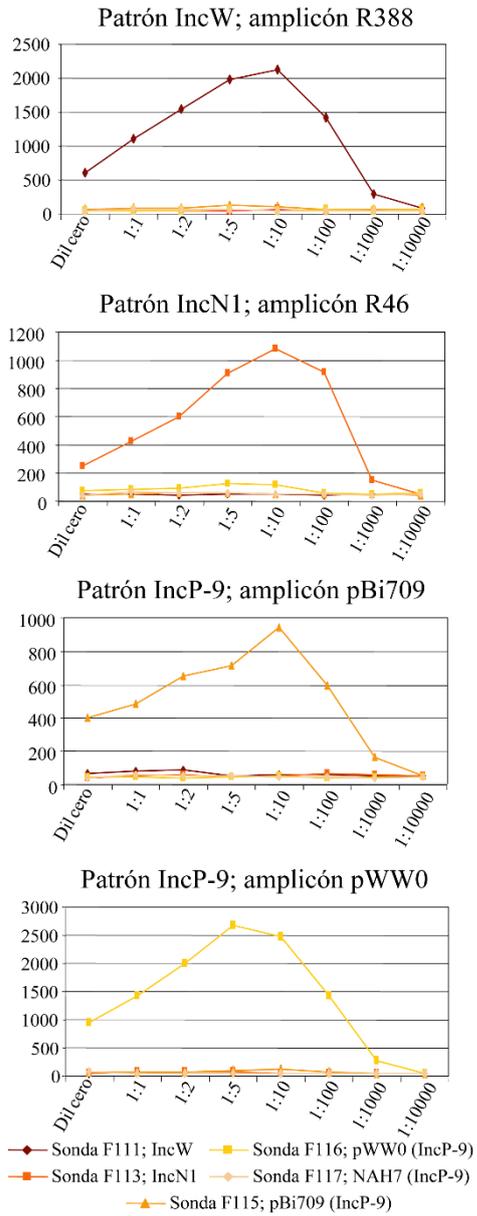


Figura suplementaria 3.2.A. Validación de las sondas MOB_{F11} para el array en suspensión. En los distintos paneles de esta figura se puede observar el comportamiento del panel experimental descrito en la leyenda de la misma, frente a distintos amplicones obtenidos como se describe en la sección 2.5. Sobre el eje de abscisas se representan las cantidades decrecientes de amplicón de doble cadena. Sobre el eje de ordenadas se representan unidades de fluorescencia arbitrarias (U.F.A.). cada punto representa la mediana de los valores de 100 mediciones individuales, como se explica en la sección 2.5. Las sondas F112 y F114 no se han añadido al panel experimental porque carecíamos de

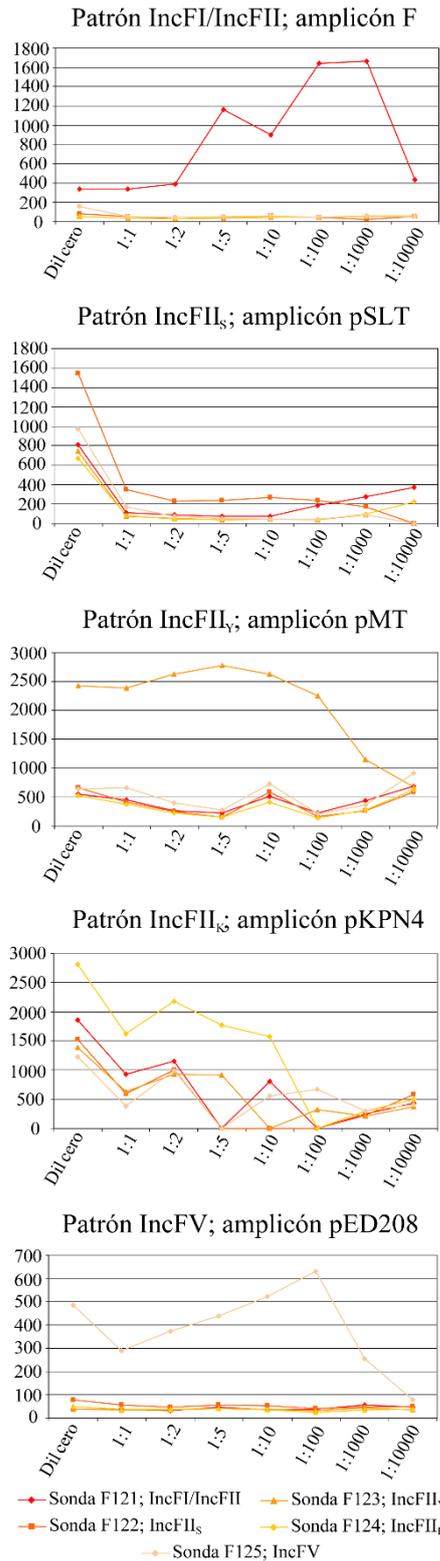
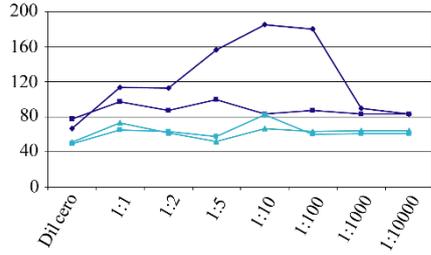
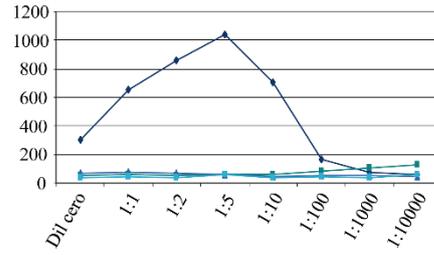


Figura suplementaria 3.2.B. Validación de las sondas MOB_{F12} para el array en suspensión. En el panel del patrón IncFII_κ, los valores U.F.A. iguales a cero corresponden a errores de lectura del hardware. Los ejes representan las mismas magnitudes que en el caso anterior.

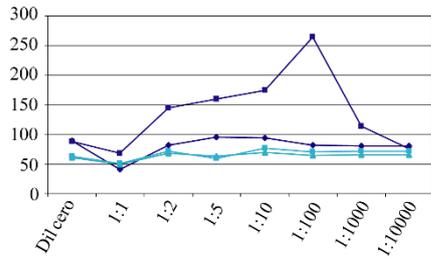
Patrón IncP1 α ; amplicón RP4



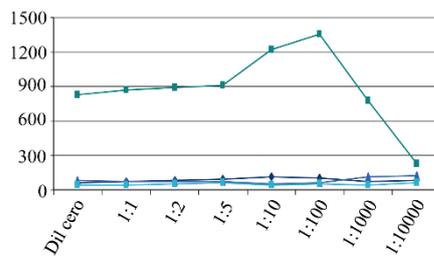
Patrón IncI1 α /I1 γ ; amplicón R64



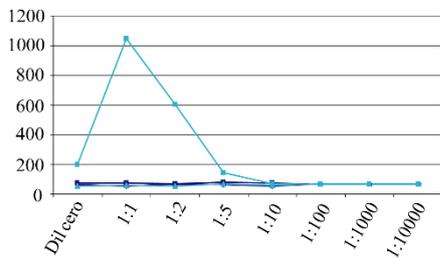
Patrón IncP1 β ; amplicón R751



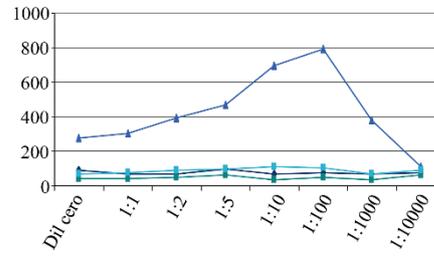
Patrón P1212; amplicón pSC138



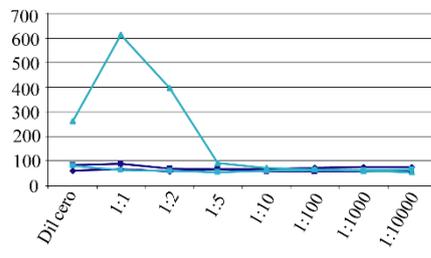
Patrón IncP1 δ ; amplicón pEST4011



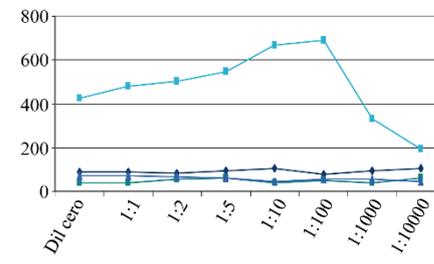
Patrón IncK; amplicón R387



Patrón IncP1 γ ; amplicón QKH54



Patrón IncB/O; amplicón pO113



◆ Sonda P11 α ; IncP1 α ■ Sonda P11 δ ; IncP1 δ
 ■ Sonda P11 β ; IncP1 β ▲ Sonda P11 γ ; IncP1 γ

◆ Sonda P1211; IncI1 α /I1 γ ▲ Sonda P1213; IncK
 ■ Sonda P1212 ■ Sonda P1214; IncB/O

Figura suplementaria 3.2.C. Validación de las sondas MOB_{P11} para el array en suspensión. Los ejes representan las mismas magnitudes que en casos anteriores.

Figura suplementaria 3.2.D. Validación de las sondas MOB_{P12} para el array en suspensión. Los ejes representan las mismas magnitudes que en casos anteriores.

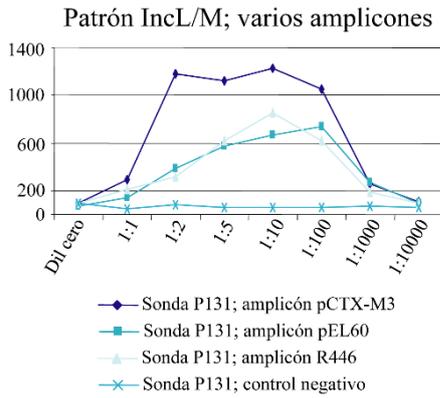


Figura suplementaria 3.2.E. Validación de la sonda MOB_{P131} para el array en suspensión. En este caso se presentan las curvas de validación para la sonda P131 frente a tres plásmidos del grupo IncL/M y un control negativo (el blanco de la PCR). El resto de la figura es igual que en casos anteriores.

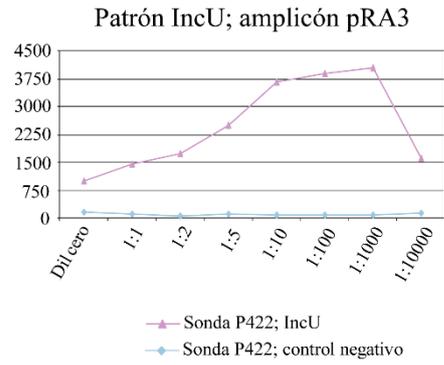


Figura suplementaria 3.2.G. Validación de la sonda MOB_{P4} para el array en suspensión. Se presenta la curva patrón del plásmido IncU pRA3 y de un control negativo (blanco de la PCR) frente a la sonda única del panel P4. Las magnitudes de los ejes son las mismas que en casos anteriores.

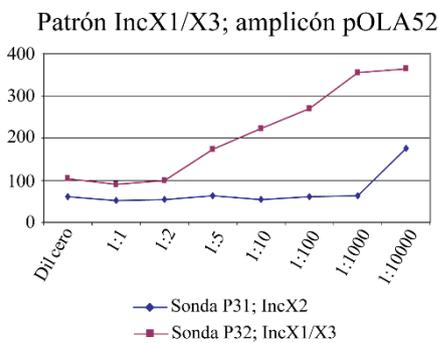
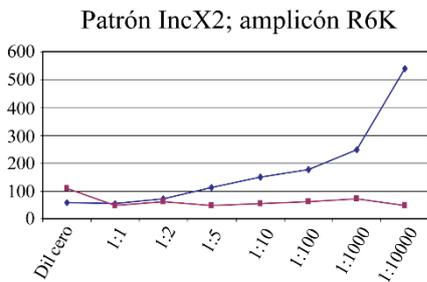


Figura suplementaria 3.2.F. Validación de las sondas MOB_{P3} para el array en suspensión. Los ejes representan las mismas magnitudes que en casos anteriores.

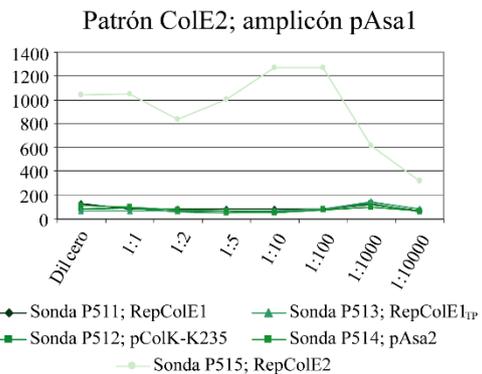
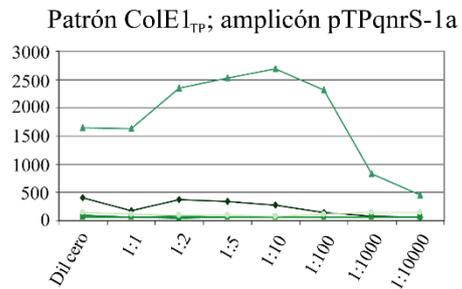
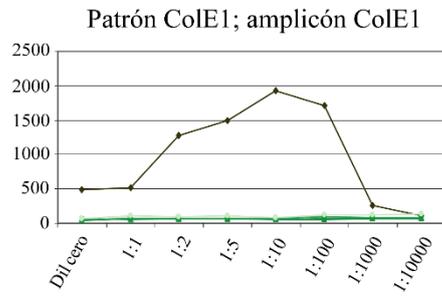


Figura suplementaria 3.2.H. Validación de las sondas MOB_{P5} para el array en suspensión. Las magnitudes son las mismas que en casos anteriores. Las curvas de validación de las sondas P512 y P514 no se hicieron por falta de controles positivos.

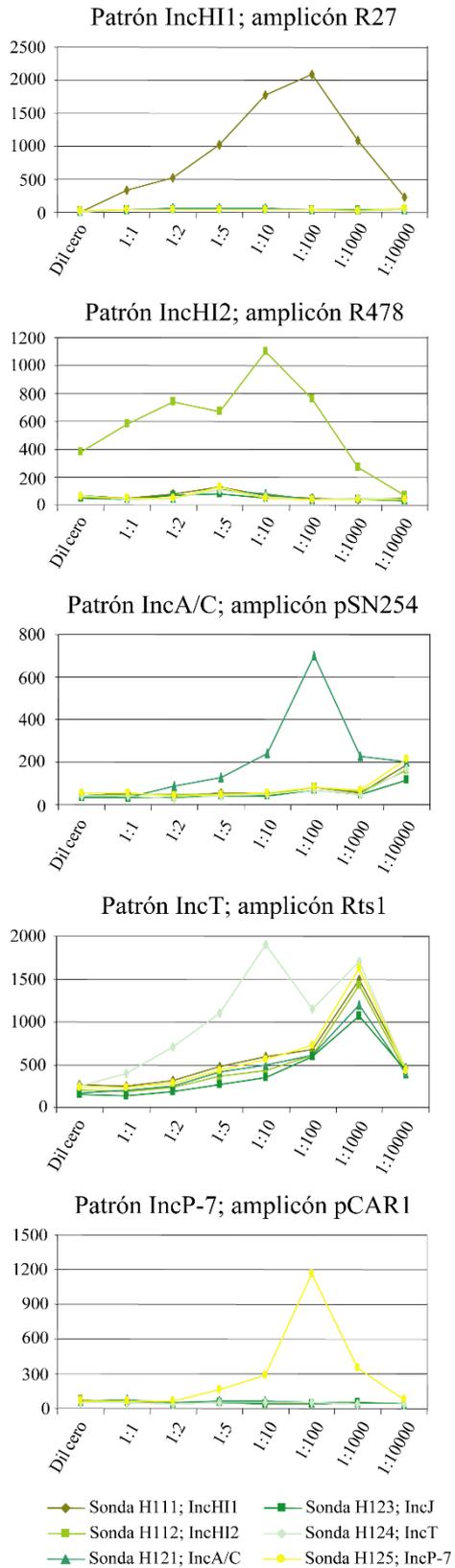


Figura suplementaria 3.2.I. Validación de las sondas MOB_H para el array en suspensión. Las magnitudes son las mismas que en casos anteriores.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Bibliografía

Tabla Suplementaria 1. Plásmidos de \square -Proteobacteria contenidos en la base de datos del NCBI¹.

Acceso GenBank	Plásmido		Calsificación Rep ²	Clisificación MOB			Taxonomía del huésped ⁶	
	Nombre	Tamaño		Clase MOB ³	Sub-clase MOB ⁴	DPMT ⁵	Huésped original	Familia
NC_007682	pMUR050	56634	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011383	plasmid 9	70655	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_011385	plasmid 12	75617	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_010643	R7K	39792	SI; W _{oriV} (Gotz et al. 1996) ; W (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Providencia rettgeri</i>	Enterobacteriaceae
NC_009982	pMAK3	39924	SI; W _{oriV} (Gotz et al. 1996) ; W (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_010716	pIE321	38150	SI; W _{oriV} (Gotz et al. 1996) ; W (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_009980	pMAK2	61571	SI; N _{oriV} (Gotz et al.); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_011617	pKP96	67850	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_003292	R46	50969	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Salmonella enterica</i> typhimurium	Enterobacteriaceae
NC_009132	pLEW517	63946	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009131	pLEW517	65288	SI; N _{oriV} (Gotz et al. 1996); N (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_010891	pCT14	55216	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Pseudomonas</i> sp. CT14	Pseudomonadaceae
NC_007926	NAH7	82232	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae
NC_003350	pWW0	116580	SI; P _{9rep} (Greated and Thomas 1999); P _{9korA3Fa-rep3Rc} ; P _{9ori3Fd-rep3Rc} (Krasowiak et al. 2002)	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae
NC_004999	pDTG1	83042	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae
NC_007506	pXCV38	38116	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	Xanthomonadaceae
NC_005240	pXcB	37106	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Xanthomonas citri</i>	Xanthomonadaceae
NC_003922	pXAC64	64920	NO	MOBF	F11	SI (F11)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306	Xanthomonadaceae
NC_003277	pSLT	93939	SI; FII _s (Carattoli et al. 2005); FIB _s (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	Enterobacteriaceae
NC_010720	p53638_75	75089	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> 53638	Enterobacteriaceae
NC_007208	pOU1113	80156	SI; FII _s (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella enterica</i>	Enterobacteriaceae
NC_002483	F	99159	SI; FIA, FIB, FIC (Carattoli et al. 2005); FII (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011413	pSE11-2	91158	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_009425	pENTE01	157749	NO	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Enterobacter</i> sp. 638	Enterobacteriaceae
NC_011603	pMAR2	97978	SI; FrepB, FII _s (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> O127:H6 str. E2348/69	Enterobacteriaceae
NC_011076	pCVM29188_146	146811	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Kentucky	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_010719	p53638_226	225683	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> 53638	Enterobacteriaceae
NC_010409	pVM01	151002	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_007675	pAPEC-O2-ColV	184501	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_006671	pAPEC-O2-R	101375	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005327	pC15-1a	92353	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_006855	pSCV50	49558	SI; FIB, FIIs (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Cholerasuis	Enterobacteriaceae
NC_008460	pO86A1	120730	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010699	pET45	44694	NO	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	Enterobacteriaceae
NC_010862	pMAR7	101558	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005); FIBs (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009602	pSFO157	121239	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011812	pO26I	72946	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009650	pKPN4	107576	SI; FIIs (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH	Enterobacteriaceae
NC_009837	pAPEC-O1-ColBM	174241	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	Enterobacteriaceae
NC_010558	pIP1206	168113	SI; FIA, FIB (Carattoli et al.)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> 1520	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_007941	pUTI89	114230	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> UTI89	Enterobacteriaceae
NC_007385	pSS_046	214396	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Enterobacteriaceae
NC_010488	pSMS35_135	130440	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	Enterobacteriaceae
NC_009133	NR1	94289	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009649	pKPN3	175879	SI; FII _K (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH	Enterobacteriaceae
NC_011747	pECOS88	133853	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> S88	Enterobacteriaceae
NC_011749	p1ESCUM	122301	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i> UMN026	Enterobacteriaceae
NC_004998	p1658/97	125491	SI; FIB (Carattoli et al. 2005); FII (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010119	pOU7519	127212	SI; FIBs, FII _s (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Cholerasuis	Enterobacteriaceae
NC_002134	R100	94281	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella flexneri</i>	Enterobacteriaceae
NC_009702	pC4602-1	56628	NO	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibrionaceae
NC_010614	pVT1	82266	NO	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Vibrio tapetis</i>	Vibrionaceae
NC_005128	pYJ016	48508	NO	MOBF	F12	SI (F12)	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	Vibrionaceae
NC_002638	pKDSC50	49503	SI; FIBs, FII _s (Villa et al. 2010)	MOBF,MOBF	F12	SI (F12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Cholerasuis	Enterobacteriaceae
NC_002698	pWR501	221851	SI; FII (Villa et al. 2010)	MOBF,MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella flexneri</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_007607	pSD1_197	182726	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF,MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Enterobacteriaceae
NC_007608	pSB4_227	126697	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	MOBF,MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella boydii</i> Sb227	Enterobacteriaceae
NC_004851	pCP301	221618	SI; RepAFII, FII (Villa et al. 2010)	MOBF,MOBF,MOBF	F12	SI (F12)	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	Enterobacteriaceae
NC_009352	pAsa5	18361	NO	MOBF	F12	NO	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. salmonicida	Aeromonadaceae
NC_009350	pAsa5	155098	NO	MOBF	F12	NO	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. salmonicida A449	Aeromonadaceae
NC_006323	pG8786	137036	SI; FII _γ (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	NO	<i>Yersinia pestis</i>	Enterobacteriaceae
NC_009378	MT	137010	SI; FII _γ (Villa et al. 2010)	MOBF	F12	NO	<i>Yersinia pestis</i> str. Pestoides F	Enterobacteriaceae
NC_010606	pACICU2	64366	SI; GR6 (Bertini et al. 2010)	MOBF	F12	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU	Moraxellaceae
NC_010422	pOU1115	74589	SI; FII _s (Villa et al. 2010); X1 (Johnson et al. 2012)	MOBF,MOBP	F12, P3	SI (P3)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_010377	pYE854	95499	NO	MOBF	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterobacteriaceae
NC_006366	pLPL	59832	NO	MOBF	NO	NO	<i>Legionella pneumophila</i> str. Lens	Legionellaceae
NC_006365	pLPP	131885	NO	MOBF	NO	NO	<i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	Legionellaceae
NC_011668	pS22302	65448	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS223	Shewanellaceae
NC_011665	pS22303	59223	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS223	Shewanellaceae
NC_011664	pS22301	88311	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS223	Shewanellaceae

Bibliografia

NC_009998	pS19501	75605	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS195	Shewanellaceae
NC_009999	pS19502	75508	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS195	Shewanellaceae
NC_009661	pS18501	83224	NO	MOBF	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS185	Shewanellaceae
NC_005871	pPBPR1	80033	NO	MOBF	NO	NO	<i>Photobacterium profundum</i> SS9	Vibrionaceae
NC_011311	pVSAL840	83540	NO	MOBF	NO	NO	<i>Aliivibrio salmonicida</i> LFI1238	Vibrionaceae
NC_011204	pCT02021853_74	74551	SI; FIIs (Villa et al. 2010); X1 (Johnson et al. 2012)	MOBF,MOBP	NO, P3	SI (P3)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_009704	plasmid_59kb	58679	NO	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	Enterobacteriaceae
NC_006388	pB3	56167	SI; P _{trfA2} (Gotz et al. 1996); trfA (Bahl et al. 2009)	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_001735	R751	53423	SI; P _{trfA2} (Gotz et al. 1996); trfA (Bahl et al. 2009)	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Enterobacteriaceae
NC_009739	pMATVIM-7	24179	NO	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae
NC_008357	pBS228	89147	SI; P _{trfA1} (Gotz et al. 1996); P (Carattoli et al. 2005); trfA (Bahl et al. 2009)	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae
NC_010000	pS19503	49148	NO	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Shewanella baltica</i> OS195	Shewanellaceae
NC_010579	pXFAS01	38297	NO	MOBP	P1	SI (P11)	<i>Xylella fastidiosa</i> M23	Xanthomonadaceae
NC_009788	pETEC_73	70609	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae
NC_011081	pSL476_91	91374	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Heidelberg	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_002122	Collb-P9	93399	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011419	pSE11-1	100021	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_011078	pCVM29188_46	46121	NO	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky	Enterobacteriaceae
NC_006856	pSC138	138742	NO	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Cholerasuis	Enterobacteriaceae
NC_005014	R64	120826	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacteriaceae
NC_007365	pO113	165548	SI; FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011754	pECOED	119594	NO	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Escherichia coli</i> ED1a	Enterobacteriaceae
NC_011077	pCVM29188_101	101461	SI; I1-Iγ (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky	Enterobacteriaceae
NC_005246	pEL60	60145	SI; L/M (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P131)	<i>Erwinia amylovora</i>	Enterobacteriaceae
NC_004464	pCTX-M3	89468	SI; L/M (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P131)	<i>Citrobacter freundii</i>	Enterobacteriaceae
NC_011641	pCTXM360	68018	SI; L/M (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	SI (P131)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_005909	pRA2	32743	NO	MOBP	P1	SI (P131)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Pseudomonadaceae
NC_010876	pXAG81	26721	NO	MOBP	P1	SI (P131)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Xanthomonadaceae
NC_004734	pTC-F14	14155	NO	MOBP	P1	SI (P14)	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Acidithiobacillaceae
NC_003123	pRAS3.1	11851	NO	MOBP	P1	SI (P14)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Aeromonadaceae
NC_003124	pRAS3.2	11823	NO	MOBP	P1	SI (P14)	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Aeromonadaceae

Bibliografia

NC_007100	Rms149	57121	NO	MOBP	P1	SI (P14)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae
NC_001520	pTF4.1	4104	NO	MOBP	P1	NO	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Acidithiobacillaceae
NC_011207	pBRST7.6	7621	NO	MOBP	P1	NO	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae
NC_002128	pO157	92721	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	NO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	Enterobacteriaceae
NC_008055	QKH54	69966	SI; trfA_□ (Bahl et al. 2009)	MOBP	P1	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010693	pET46	46159	NO	MOBP	P1	NO	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	Enterobacteriaceae
NC_002523	pADAP	153404	NO	MOBP	P1	NO	<i>Serratia entomophila</i>	Enterobacteriaceae
NC_007414	pO157	92077	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	NO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	Enterobacteriaceae
NC_011350	pO157	94644	SI; FrepB, FIB (Carattoli et al. 2005)	MOBP	P1	NO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	Enterobacteriaceae
NC_007098	pKMA2425	3156	NO	MOBP	P1	NO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_004632	pDC3000B	67473	NO	MOBP	P1	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	Pseudomonadaceae
NC_004633	pDC3000A	73661	NO	MOBP	P1	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000	Pseudomonadaceae
NC_010657	pBS512_33	33103	SI; X4 (Johnson et al. 2012)	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	Enterobacteriaceae
NC_010421	pOU1114	34595	SI; X1 (Johnson et al. 2012)	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Dublin	Enterobacteriaceae
NC_010860	pSE34	32950	SI; X1 (Johnson et al. 2012)	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_011739	p2ESCU	33809	SI; X1 (Johnson et al. 2012)	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Escherichia coli</i> UMN026	Enterobacteriaceae
NC_010555	pHI4320	36289	NO	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Proteus mirabilis</i> HI4320	Enterobacteriaceae
NC_010378	pOLA52	51602	SI; X1 (Johnson et al. 2012)	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_002579	pVT745	25407	NO	MOBP	P3	SI (P3)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Pasteurellaceae
NC_010919	pRA3	45909	SI; U (García-Fernández et al. 2009)	MOBP	P4	SI (P4)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae
NC_006143	pFBAOT6	84749	SI; U (García-Fernández et al. 2009)	MOBP	P4	SI (P4)	<i>Aeromonas punctata</i>	Aeromonadaceae
NC_002490	pXF51	51158	NO	MOBP	P4	SI (P4)	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	Xanthomonadaceae
NC_004925	pAsa2	5247	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	Aeromonadaceae
NC_004340	pAsa3	5249	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Aeromonadaceae
NC_011407	pSE11-4	6929	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_005910	pAlvA	5113	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Hafnia alvei</i>	Enterobacteriaceae
NC_005911	pAlvB	5216	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Hafnia alvei</i>	Enterobacteriaceae
NC_011082	pSL476_3	3373	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Heidelberg	Enterobacteriaceae
NC_011404	pEC01	5002	SI; CoIE (García-Fernández et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Enterobacter cloacae</i>	Enterobacteriaceae
NC_009791	pETEC_5	5033	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_009794	pCKO2	5601	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	Enterobacteriaceae
NC_001371	ColE1	6646	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_003457	pC	5269	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enteritidis</i>	Enterobacteriaceae
NC_003456	pK	4245	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enteritidis</i>	Enterobacteriaceae
NC_011418	pEC278	4669	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010898	pIGRW12	4995	SI; ColE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011408	pSE11-5	5366	SI; ColE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_010993	pST728/06-2	10107	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Enterobacteriaceae
NC_006881	pColK-K235	8318	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005970	pRK2	5360	SI; ColE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011799	p5217	5217	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009807	pTPqnrS-1a	10066	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Enterobacteriaceae
NC_005019	pLG13	6293	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_001848	pBERT	4656	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Berta	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_010796	pRK10	4241	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Serratia marcescens</i>	Enterobacteriaceae
NC_010485	pSMS35_8	8909	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	Enterobacteriaceae
NC_011214	pSL491_5	5880	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Virchow	Enterobacteriaceae
NC_003079	pSFD10	4091	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Enterobacteriaceae
NC_010672	pBS512_7	7437	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	Enterobacteriaceae
NC_001373	ColA	6720	NO	MOBP	P5	SI (P51)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_000923	pRAY	6076	NO	MOBP,MOBP	P5	SI (P51)	<i>Acinetobacter sp.</i> SUN	Moraxellaceae
NC_002637	pMHSCS1	4992	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae
NC_001774	pIG1	5360	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_006868	pCCK647	5198	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_009625	pARD3079	4065	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_010069	p9555	5673	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_007097	pKM757	4556	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus porcitonillarum</i>	Pasteurellaceae
NC_010042	p9956	5674	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_010941	ABB7_B	4236	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 7 str. AP76	Pasteurellaceae

Bibliografia

NC_010940	APP7_C	3533	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 7 str. AP76	Pasteurellaceae
NC_006976	pCCK3259	5317	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae
NC_007099	pPSAS1522	4244	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_006828	pHS-Tet	5147	NO	MOBP	P5	SI (P52)	<i>Haemophilus parasuis</i>	Pasteurellaceae
NC_004338	pAsa1	6371	NO	MOBP	P5	SI (P53)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Aeromonadaceae
NC_004924	pAsa3	5616	NO	MOBP	P5	SI (P53)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	Aeromonadaceae
NC_004923	pAsa1	5424	NO	MOBP	P5	SI (P53)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	Aeromonadaceae
NC_004339	pAsa2	5424	NO	MOBP	P5	SI (P53)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Aeromonadaceae
NC_008488	pMG828-3	5219	NO	MOBP	P5	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005325	pEMCJH03	3510	NO	MOBP	P5	NO	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Moraxellaceae
NC_009516	pRWF101	13956	NO	MOBP	P5	NO	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	Moraxellaceae
NC_010900	pMBO-2	27075	NO	MOBP	P5	NO	<i>Moraxella bovis</i> Epp63	Moraxellaceae
NC_005247	pEU30	30314	NO	MOBP	P6	NO	<i>Erwinia amylovora</i>	Enterobacteriaceae
NC_010697	pET49	48751	NO	MOBP	P6	NO	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	Enterobacteriaceae
NC_010696	pET35	35494	NO	MOBP	P6	NO	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_011148	unnamed	37978	NO	MOBP	P6	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona	Enterobacteriaceae
NC_002525	R721	75582	NO	MOBP	P6	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011351	pEC4115	37452	NO	MOBP	P6	NO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	Enterobacteriaceae
NC_007206	pF1947	32628	NO	MOBP	P6	NO	<i>Haemophilus influenzae</i> biotype <i>aegyptius</i>	Pasteurellaceae
NC_004846	pF3031	32433	NO	MOBP	P6	NO	<i>Haemophilus influenzae</i> biotype <i>aegyptius</i>	Pasteurellaceae
NC_004058	pF3028	32379	NO	MOBP	P6	NO	<i>Haemophilus influenzae</i> biotype <i>aegyptius</i>	Pasteurellaceae
NC_005918	pPMA4326A	46697	NO	MOBP	P6	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Pseudomonadaceae
NC_005919	pPMA4326B	40110	NO	MOBP	P6	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Pseudomonadaceae
NC_005205	pPSR1	72601	NO	MOBP	P6	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Pseudomonadaceae
NC_007275	Small plasmid	51711	NO	MOBP	P6	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	Pseudomonadaceae
NC_009777	pVIBHAR	89008	NO	MOBP	P6	NO	<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA- 1116	Vibrionaceae
NC_006842	pES100	45849	NO	MOBP	P6	NO	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	Vibrionaceae
NC_001898	pUCD5000	5229	NO	MOBP	NO	SI (P51)	<i>Pantoea citrea</i>	Enterobacteriaceae
NC_002632	pPvuI	4675	NO	MOBP	NO	NO	<i>Proteus vulgaris</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_011604	pWES-1	10908	NO	MOBP	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Westhampton	Enterobacteriaceae
NC_010893	pMBO-1	44215	NO	MOBP	NO	NO	<i>Moraxella bovis</i> Epp63	Moraxellaceae
NC_011131	pLQ510	12084	NO	MOBP	NO	NO	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Moraxellaceae
NC_004771	pJR1	6792	NO	MOBP	NO	NO	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_010795	pHB0503	15079	NO	MOBP	NO	NO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_010675	pKW1	4583	NO	MOBP	NO	NO	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A	Pseudoalteromonadaceae
NC_004961	pPS41	6886	NO	MOBP	NO	NO	<i>Vibrio</i> sp. 41	Vibrionaceae
NC_010600	pTcM1	65158	NO	MOBP,MOBQ	NO	NO	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Acidithiobacillaceae
NC_002636	DN1	5112	NO	MOBQ	Q11	SI (Q11)	<i>Dichelobacter nodosus</i>	Cardiobacteriaceae
NC_001740	RSF1010	8684	SI; Q _{oriV} (Gotz et al. 1996)	MOBQ	Q11	SI (Q11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005312	pMS260	8124	NO	MOBQ	Q11	SI (Q11)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_011378	pCCK1900	10226	SI; Q _{oriV} (Gotz et al. 1996)	MOBQ	Q11	SI (Q11)	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_006994	pCCK381	10874	NO	MOBV, MOBQ	NO, Q11	SI (Q11)	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_009781	pIGJC156	5146	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011093	pCVM19633_4	4585	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Schwarzengrund	Enterobacteriaceae
NC_003455	pP	4301	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Salmonella enteritidis</i>	Enterobacteriaceae
NC_010659	pBS512_5	5114	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_008489	pMG828-4	7462	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010695	pET09	9299	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	Enterobacteriaceae
NC_002056	pSC101	9263	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacteriaceae
NC_010310	pAV2	15135	NO	MOBQ	Q12	SI (Q12)	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Moraxellaceae
NC_011411	pSE11-6	4082	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_010885	pIGWZ12	4072	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010883	pIGMS5	6750	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_008487	pMG828-2	4091	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010486	pSMS35_4	4074	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	Enterobacteriaceae
NC_011228	pO26-S4	6758	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_007505	pXCV19	19146	NO	MOBQ	Qu	SI (Qu)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	Xanthomonadaceae
NC_009476	pAb5S9	24716	NO	MOBQ	Qu	NO	<i>Aeromonas bestiarum</i>	Aeromonadaceae
NC_010401	p1ABAYE	5644	SI; GR11 (Bertini et al. 2010)	MOBQ	Qu	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	Moraxellaceae
NC_009966	pLD-TEX-KL	66512	NO	MOBQ	NO	NO	<i>Fluoribacter dumoffii</i>	Legionellaceae
NC_006877	pMAC	9540	SI; GR8 (Bertini et al. 2010)	MOBQ	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Moraxellaceae
NC_010396	p2ABSDF	25014	SI; GR12, GR18 (Bertini et al. 2010)	MOBQ	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	Moraxellaceae
NC_010398	p3ABSDF	24922	SI; GR7, GR9, GR15 (Bertini et al. 2010)	MOBQ	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	Moraxellaceae

Bibliografia

NC_010889	p12494	14393	NO	MOBQ	NO	NO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_005921	pPMA4326C	8244	NO	MOBQ	NO	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Pseudomonadaceae
NC_002305	R27	180461	SI; H11 (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Salmonella typhi</i>	Enterobacteriaceae
NC_003384	pHCM1	218160	SI; H11 (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	Enterobacteriaceae
NC_009981	pMAK1	208409	SI; H11 (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis	Enterobacteriaceae
NC_010870	pK29	269674	SI; H12 (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_005211	R478	274762	SI; H12 (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Serratia marcescens</i>	Enterobacteriaceae
NC_009838	pAPEC-O1-R	241387	NO	MOBH	H11	SI (H11)	<i>Escherichia coli</i> APEC O1	Enterobacteriaceae
NC_009349	pAsa4	166749	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	Aeromonadaceae
NC_009141	pIP1202	182913	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Yersinia pestis</i> biovar Orientalis str. IP275	Enterobacteriaceae
NC_009140	pSN254	176473	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport	Enterobacteriaceae
NC_009139	pYR1	158038	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Yersinia ruckeri</i>	Enterobacteriaceae
NC_008612	pP99-018	150157	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Vibrionaceae
NC_008613	pP91278	131520	NO	MOBH	H12	SI (H121)	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Vibrionaceae

Bibliografia

NC_011838	pCAR1.2	200231	NO	MOBH	H12	SI (H11)	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Pseudomonadaceae
NC_004444	pCAR1	199035	NO	MOBH	H12	SI (H11)	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Pseudomonadaceae
NC_003905	Rts1	217182	SI; T (Carattoli et al. 2005)	MOBH	H12	NO	<i>Proteus vulgaris</i>	Enterobacteriaceae
NC_008573	plasmid 1	278942	NO	MOBH	H12	NO	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Shewanellaceae
NC_008739	pMAQU02	213290	NO	MOBH	H2	SI (H2)	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	Alteromonadaceae
NC_011409	plasmid ICEhin1056	59393	NO	MOBH	H2	NO	<i>Haemophilus influenzae</i>	Pasteurellaceae
NC_009793	pCKO3	9294	NO	MOBC	C11	SI (C11)	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	Enterobacteriaceae
NC_011382	plasmid 15S	23753	NO	MOBC	C11	SI (C11)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_002119	ClōDF13	9957	NO	MOBC	C11	SI (C11)	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010726	pMET-1	41723	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_011092	pCVM19633_110	110227	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar	Enterobacteriaceae
NC_006154	pYptb32953	27702	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	Enterobacteriaceae
NC_009779	pESA2	31208	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	Enterobacteriaceae
NC_005814	pCRY	21742	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001	Enterobacteriaceae
NC_010112	p23023	52527	NO	MOBC	C12	SI (C12)	<i>Vibrio</i> sp. 23023	Vibrionaceae
NC_006858	pVS54	5360	NO	MOBC	NO	NO	<i>Vibrio salmonicida</i> LFI1238	Vibrionaceae

Bibliografia

NC_011315	pVSAL54	5360	NO	MOBC	NO	NO	<i>Aliivibrio salmonicida</i> LF11238	Vibrionaceae
NC_011406	pIGMS31	2520	NO	MOBV	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_005569	pBHRK19	5721	NO	MOBV	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005568	pBHRK18	5721	NO	MOBV	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009624	pKMA202	13425	NO	MOBV	NO	NO	<i>Actinobacillus porcitonisillarum</i>	Pasteurellaceae
NC_005920	pPMA4326D	4833	NO	MOBV	NO	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Maculicola	Pseudomonadaceae
NC_005922	pPMA4326E	4217	NO	MOBV	NO	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola	Pseudomonadaceae
NC_005023	pTF5	19792	NO	NO	NO	NO	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Acidithiobacillaceae
NC_008738	pMAQU01	239623	NO	NO	NO	NO	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	Alteromonadaceae
NC_007483	plasmid A	40420	NO	NO	NO	NO	<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707	Chromatiaceae
NC_011526	pQpRS_K_Q154	39280	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i> CbuK_Q154	Coxiellaceae
NC_010258	QpRS	39281	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i> 'MSU Goat Q177'	Coxiellaceae
NC_009726	pQpDG	54179	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i> Dugway 5J108-111	Coxiellaceae
NC_004704	pQpH1	37393	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493	Coxiellaceae
NC_002118	QpH1	37329	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i>	Coxiellaceae
NC_010115	QpH1	37317	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 331	Coxiellaceae

Bibliografía

NC_002131	QpDV	32601	NO	NO	NO	NO	<i>Coxiella burnetii</i>	Coxiellaceae
NC_009789	pETEC_6	6199	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae
NC_009780	pESA3	131196	NO	NO	NO	NO	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	Enterobacteriaceae
NC_009787	pETEC_35	34367	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae
NC_009786	pETEC_80	79237	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae
NC_010635	pYPTS01	69812	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	Enterobacteriaceae
NC_002120	pYVe227	69673	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterobacteriaceae
NC_002127	pOSAK1	3306	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	Enterobacteriaceae
NC_006815	pU302S	3208	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacteriaceae
NC_006816	pU302L	84514	SI; FIA, FIB, (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacteriaceae
NC_011405	pIGRK	2348	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_009790	pETEC_74	74224	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> E24377A	Enterobacteriaceae
NC_002809	ColJs	5210	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i>	Enterobacteriaceae
NC_010925	pPA3.0	2901	NO	NO	NO	NO	<i>Pantoea agglomerans</i>	Enterobacteriaceae
NC_001910	pLeu-Sg	7967	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i> (Schizaphis graminum)	Enterobacteriaceae
NC_001911	pLeu-Dn	7768	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_002487	pCol-let	5847	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011878	pLeu-BCc	6054	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Cinara cedri</i>)	Enterobacteriaceae
NC_011416	pSE11-3	60555	SI; FIB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> SE11	Enterobacteriaceae
NC_011417	pEC904	3066	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_008122	pCD	70299	SI; FII _Y (Villa et al.)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	Enterobacteriaceae
NC_008120	pMT	96471	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	Enterobacteriaceae
NC_008121	pPCP	10777	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	Enterobacteriaceae
NC_010064	pLMO226	2004	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010656	pBS512_2	2089	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	Enterobacteriaceae
NC_008053	pHW15	3002	NO	NO	NO	NO	<i>Rahnella</i> sp. 'WMR15'	Enterobacteriaceae
NC_004429	pIS2	6349	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_008439	pKKTET7	8401	SI; CoIE, CoIE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i>	Enterobacteriaceae
NC_011266	pO26-S1	1549	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_004936	pEsp1396	5622	SI; CoIE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Enterobacter</i> sp. RFL1396	Enterobacteriaceae
NC_002497	pEI1	4807	SI; CoIE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Enterobacteriaceae
NC_002498	pEI2	5643	NO	NO	NO	NO	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Enterobacteriaceae
NC_002144	pYC	5919	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_002145	pKL1	1549	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_002142	pB171	68817	SI; FIBs, FII (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011281	pKP91	91096	SI; FII _K (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	Enterobacteriaceae
NC_011282	pKP187	187922	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	Enterobacteriaceae
NC_005570	p29807	2682	SI; ColE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterobacteriaceae
NC_001378	pKYM	2083	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i>	Enterobacteriaceae
NC_008597	pVI678	6222	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011602	pE2348-2	6147	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> O127:H6 str. E2348/69	Enterobacteriaceae
NC_008119	pPCP	10778	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Nepal516	Enterobacteriaceae
NC_008118	pMT	100918	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Nepal516	Enterobacteriaceae
NC_008444	p9705	3172	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011079	pSL254_3	3605	SI; ColE (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Newport	Enterobacteriaceae
NC_010896	pAnkS	8271	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella typhimurium</i>	Enterobacteriaceae
NC_010894	pGY1	3592	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Paratyphi	Enterobacteriaceae
NC_002773	p2457TS2	3179	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella flexneri</i> 2a	Enterobacteriaceae
NC_003789	pMGD2	3564	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella</i> sp. KCL-2	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_010257	MccC7-H22	32014	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010259	pA172	8197	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Newport	Enterobacteriaceae
NC_009345	pSS046_spA	8401	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Enterobacteriaceae
NC_003134	pMT1	96210	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> CO92	Enterobacteriaceae
NC_005862	Cryptic plasmid	6066	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar	Enterobacteriaceae
NC_011227	pO26-S3	4073	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_003486	pJHCMW1	11354	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_010660	pBS512_211	210919	SI; FrepB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	Enterobacteriaceae
NC_005324	p9123	6222	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_001537	pECO29	3895	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_008486	pMG828-1	1902	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009705	plasmid_153kb	153140	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758	Enterobacteriaceae
NC_010500	pUO-SbR5	6478	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Brandenburg	Enterobacteriaceae
NC_005248	pIGAL1	8145	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_005249	pLVPK	219385	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_008490	pMG828-5	8985	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010261	pH205	8197	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_011514	pTN38148	10669	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011512	p9701	4840	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_004564	pYVa127/90	66591	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterobacteriaceae
NC_003114	pCRP3	3172	NO	NO	NO	NO	<i>Citrobacter rodentium</i>	Enterobacteriaceae
NC_004555	pBBp1	2399	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i> str. Bp (Baizongia)	Enterobacteriaceae
NC_007635	pCoo	98396	SI; FrepB, I1-I ₇ (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010886	pK245	98264	SI; R (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_009716	pAK51	6511	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia</i> sp. Sflu5	Enterobacteriaceae
NC_011795	p6148	6148	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010158	pMT-pPCP	114570	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Angola	Enterobacteriaceae
NC_010157	new_pCD	68190	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Angola	Enterobacteriaceae
NC_005706	pEA29	28185	NO	NO	NO	NO	<i>Erwinia amylovora</i>	Enterobacteriaceae
NC_005018	pKPN2	4196	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_005015	pIP843	7086	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_005017	pYVe8081	67720	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterobacteriaceae
NC_004940	pEA1.7	1711	NO	NO	NO	NO	<i>Erwinia amylovora</i>	Enterobacteriaceae
NC_004834	pEJ30	29593	NO	NO	NO	NO	<i>Erwinia</i> sp. Ejp 556	Enterobacteriaceae
NC_004835	pMT1	100984	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> KIM	Enterobacteriaceae
NC_004836	pCD1	70504	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> KIM	Enterobacteriaceae
NC_004837	pPCP1	9610	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> KIM	Enterobacteriaceae
NC_004838	pMT-1	100990	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> KIM	Enterobacteriaceae
NC_004839	pCD1	70559	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> KIM	Enterobacteriaceae
NC_003131	pCD1	70305	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> CO92	Enterobacteriaceae
NC_003132	pPCP1	9612	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> CO92	Enterobacteriaceae
NC_010499	pUO-SbR3	6847	SI; P (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Brandenburg	Enterobacteriaceae
NC_007713	pSG1	83306	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	Enterobacteriaceae
NC_007714	pSG2	27240	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	Enterobacteriaceae
NC_007715	pSG3	10810	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i> str. 'morsitans'	Enterobacteriaceae
NC_009829	pSPRO01	46804	NO	NO	NO	NO	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	Enterobacteriaceae
NC_006153	pYV	68525	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_003435	pCA4	3078	NO	NO	NO	NO		Enterobacteriaceae
NC_005816	pPCP1	9609	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001	Enterobacteriaceae
NC_002252	pTrp	7258	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS	Enterobacteriaceae
NC_002253	pLeu	7786	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i> str. APS	Enterobacteriaceae
NC_002090	NTP16	8255	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009653	pKPN7	3478	SI; ColE, ColE _{Trp} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH	Enterobacteriaceae
NC_009652	pKPN6	4259	SI; ColE, ColE _{Trp} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH	Enterobacteriaceae
NC_009651	pKPN5	88582	SI; R (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH	Enterobacteriaceae
NC_009344	pSD197_spA	8953	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Enterobacteriaceae
NC_009347	pSS046_spC	2101	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Enterobacteriaceae
NC_009346	pSS046_spB	5153	NO	NO	NO	NO	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	Enterobacteriaceae
NC_011767	pECA1039	5620	NO	NO	NO	NO	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Enterobacteriaceae
NC_005002	pB	1983	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enteritidis</i>	Enterobacteriaceae
NC_004445	pEP36	35904	NO	NO	NO	NO	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	Enterobacteriaceae
NC_004446	pEA2.8	2825	NO	NO	NO	NO	<i>Erwinia amylovora</i>	Enterobacteriaceae
NC_004843	pBPS1	2308	NO	NO	NO	NO	<i>Buchnera aphidicola</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_010487	pSMS35_3	3565	SI; ColE (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	Enterobacteriaceae
NC_003425	pWb1	5280	NO	NO	NO	NO	<i>Wigglesworthia glossinidia</i>	Enterobacteriaceae
NC_005813	pCD1	70159	SI; Fli _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001	Enterobacteriaceae
NC_005815	pMT1	106642	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> biovar Microtus str. 91001	Enterobacteriaceae
NC_005923	pFL129	6464	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011759	pGDT4	94967	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Enterobacteriaceae
NC_011752	p55989p	72482	SI; FIB (Carattoli et al. 2005)	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i> 55989	Enterobacteriaceae
NC_003385	pHCM2	106516	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhi	Enterobacteriaceae
NC_011215	pSL491_3	3176	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Virchow	Enterobacteriaceae
NC_002070	pPZG500	3661	NO	NO	NO	NO	<i>Pantoea citrea</i>	Enterobacteriaceae
NC_010101	pMM200	12245	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_010100	pMM234	9080	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_011743	pEFER	55150	SI; R (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Escherichia fergusonii</i>	Enterobacteriaceae
NC_002610	pKleB-k17/80	5258	SI; ColE, ColE _{TP} (García-Fernández et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_007183	pSG1	81553	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografía

NC_007182	pSG1	81553	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_007185	pSG2	27240	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_007184	pSG2	27240	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_007187	pSG4	10816	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_007186	pSG3	19201	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_007188	pSG4	10816	NO	NO	NO	NO	<i>Sodalis glossinidius</i>	Enterobacteriaceae
NC_010731	pSP70	3306	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_009595	pCD1	70305	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> CA88-4125	Enterobacteriaceae
NC_009596	pMT1	96210	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> CA88-4125	Enterobacteriaceae
NC_011511	p169	3679	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_011513	pRPCMY	3805	NO	NO	NO	NO	<i>Proteus mirabilis</i>	Enterobacteriaceae
NC_009377	CD	71507	SI; FII _Y (Villa et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F	Enterobacteriaceae
NC_011422	pBSSB1	27037	NO	NO	NO	NO	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhi	Enterobacteriaceae
NC_011640	pKpn114	4211	SI; ColE, ColE _{TP} (Garcia-Fernandez et al. 2009)	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae
NC_008791	pYVe8081	67721	NO	NO	NO	NO	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. enterocolitica	Enterobacteriaceae
NC_010904	pColG	4715	NO	NO	NO	NO	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae
NC_004989	R478	2120	NO	NO	NO	NO	<i>Serratia marcescens</i>	Enterobacteriaceae

Bibliografia

NC_006625	pK2044	224152	NO	NO	NO	NO	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	Enterobacteriaceae
NC_004952	pFNL10	3990	NO	NO	NO	NO	<i>Francisella novicida</i>	Francisellaceae
NC_010331	pFPHI01	3936	NO	NO	NO	NO	<i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>philomiragia</i>	Francisellaceae
NC_002109	pOM1	4442	NO	NO	NO	NO	<i>Francisella tularensis</i>	Francisellaceae
NC_009084	pAB2	11302	SI; GR2 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	Moraxellaceae
NC_009083	pAB1	13408	NO	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	Moraxellaceae
NC_010395	p1ABSDF	6106	SI; GR1 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	Moraxellaceae
NC_010402	p2ABAYE	9661	SI; GR2 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	Moraxellaceae
NC_010403	p4ABAYE	2726	SI; GR14 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	Moraxellaceae
NC_010404	p3ABAYE	94413	SI; GR13 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	Moraxellaceae
NC_002760	pAC450	4379	NO	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter</i> sp. EB104	Moraxellaceae
NC_001316	pTA144 Dw	1313	NO	NO	NO	NO	<i>Moraxella</i> sp. TA144	Moraxellaceae
NC_001315	pTA144	1921	NO	NO	NO	NO	<i>Moraxella</i> sp. TA144	Moraxellaceae
NC_011585	pAB0057	8729	SI; GR2 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB0057	Moraxellaceae
NC_009517	pRWF102	2117	NO	NO	NO	NO	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1	Moraxellaceae
NC_010309	pAV1	10820	NO	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Moraxellaceae

Bibliografia

NC_010481	pABIR	29823	SI; GR12 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Moraxellaceae
NC_007968	plasmid 1	41221	NO	NO	NO	NO	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	Moraxellaceae
NC_010605	pACICU1	28279	SI; GR2, GR10 (Bertini et al. 2010)	NO	NO	NO	<i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU	Moraxellaceae
NC_005915	pKAP298	49112	NO	NO	NO	NO	<i>Caedibacter taeniospiralis</i>	Order Thiotrichales
NC_010912	pYMH5	5047	NO	NO	NO	NO	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Pasteurellaceae
NC_009623	pKMA5	9549	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus porcitonisillarum</i>	Pasteurellaceae
NC_005329	pNAD1	5568	NO	NO	NO	NO	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Pasteurellaceae
NC_007800	pCCK13698	14969	NO	NO	NO	NO	<i>Bibersteinia trehalosi</i>	Pasteurellaceae
NC_004345	p9L	1338	NO	NO	NO	NO	<i>Histophilus somni</i>	Pasteurellaceae
NC_005245	p250	6286	NO	NO	NO	NO	<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Pasteurellaceae
NC_007094	pKMA505	8632	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus porcitonisillarum</i>	Pasteurellaceae
NC_004772	pJR2	5252	NO	NO	NO	NO	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae
NC_003125	pTYM1	4242	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Pasteurellaceae
NC_010942	APP7_A	5685	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 7 str. AP76	Pasteurellaceae
NC_002664	p57/98	1065	NO	NO	NO	NO	<i>Histophilus somni</i>	Pasteurellaceae
NC_007096	pKMA1467	11115	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus porcitonisillarum</i>	Pasteurellaceae

Bibliografia

NC_007095	pIMD50	8751	NO	NO	NO	NO	<i>Actinobacillus porcitonillarum</i>	Pasteurellaceae
NC_003411	pMVSCS1	5621	NO	NO	NO	NO	<i>Mannheimia varigena</i>	Pasteurellaceae
NC_006829	pHS-Rec	9462	NO	NO	NO	NO	<i>Haemophilus parasuis</i>	Pasteurellaceae
NC_006298	pHS129	5178	NO	NO	NO	NO	<i>Haemophilus somnus</i> 129PT	Pasteurellaceae
NC_002175	pMTS1	1995	NO	NO	NO	NO	<i>Methylophaga thalassica</i>	Piscirickettsiaceae
NC_010722	pMM1	2140	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae
NC_002518	pPP81	2534	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae
NC_009444	pQBR103	425094	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Pseudomonadaceae
NC_002759	pFKN	39554	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola	Pseudomonadaceae
NC_005244	pND6-1	101858	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas</i> sp. ND6	Pseudomonadaceae
NC_008275	pWW53	107929	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae
NC_007274	Large plasmid	131950	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A	Pseudomonadaceae
NC_006988	p47L	3084	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	Pseudomonadaceae
NC_006989	p47S	1782	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas</i> sp. S-47	Pseudomonadaceae
NC_004969	pPSIM3	3138	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PSIM3	Pseudomonadaceae
NC_004951	pNI10	5128	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas fulva</i>	Pseudomonadaceae
NC_005009	pYQ39	2297	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadaceae

Bibliografía

NC_003892	pQBR55	5924	NO	NO	NO	NO	<i>Pseudomonas</i> sp. SLT2001	Pseudomonadaceae
NC_008320	plasmid 1	6499	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella</i> sp. MR-7	Shewanellaceae
NC_004349	pMR-1	161613	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	Shewanellaceae
NC_009037	pSbal03	16762	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS155	Shewanellaceae
NC_009036	pSbal02	74000	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS155	Shewanellaceae
NC_009035	pSbal01	116763	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS155	Shewanellaceae
NC_009038	pSbal04	7995	NO	NO	NO	NO	<i>Shewanella baltica</i> OS155	Shewanellaceae
NC_010910	pVCG4.1	2163	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrionaceae
NC_011403	pES213	5501	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio fischeri</i>	Vibrionaceae
NC_006860	pSIO1	4906	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrionaceae
NC_006859	pVS43	4327	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio salmonicida</i> LF11238	Vibrionaceae
NC_010734	pAK1	13415	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio shilonii</i>	Vibrionaceae
NC_010733	pSFn1	11237	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	Vibrionaceae
NC_010899	pVCG1.2	2357	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrionaceae
NC_010897	pVCG1.1	4439	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrionaceae
NC_008690	pTC68	7847	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio</i> sp. TC68	Vibrionaceae
NC_005250	pJM1	65009	NO	NO	NO	NO	<i>Listonella anguillarum</i>	Vibrionaceae
NC_009703	pC4602-2	66946	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibrionaceae
NC_011316	pVSAL43	4327	NO	NO	NO	NO	<i>Aliivibrio salmonicida</i> LF11238	Vibrionaceae

Bibliografía

NC_011314	pVSAL320	30807	NO	NO	NO	NO	<i>Aliivibrio salmonicida</i> LFI1238	Vibrionaceae
NC_002088	pSA19	4839	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vibrionaceae
NC_009351	pLO2	7941	NO	NO	NO	NO	<i>Listonella anguillarum</i> serovar O2	Vibrionaceae
NC_011797	pBD146	7472	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio fluvialis</i>	Vibrionaceae
NC_011185	pMJ100	179459	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio fischeri</i> MJ11	Vibrionaceae
NC_002473	pO3K6	8784	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vibrionaceae
NC_010114	p09022A	31036	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio</i> sp. 09022	Vibrionaceae
NC_010113	p0908	81413	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio</i> sp. 0908	Vibrionaceae
NC_004982	pTLC	4719	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibrionaceae
NC_009701	pR99	68446	NO	NO	NO	NO	<i>Vibrio vulnificus</i>	Vibrionaceae
NC_007504	pXCV2	1852	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	Xanthomonadaceae
NC_007507	pXCV183	182572	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria str. 85-10	Xanthomonadaceae
NC_002489	pXF1.3	1286	NO	NO	NO	NO	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	Xanthomonadaceae
NC_003921	pXAC33	33700	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306	Xanthomonadaceae
NC_010429	pSH1	6867	NO	NO	NO	NO	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadaceae
NC_010872	pAG1	15143	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. glycines	Xanthomonadaceae

Bibliografía

NC_004554	pXFPD1.3	1346	NO	NO	NO	NO	<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula1	Xanthomonadaceae
NC_010887	pXAG82	1315	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Xanthomonadaceae
NC_010464	pSM76	2927	NO	NO	NO	NO	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadaceae
NC_002092	pXF868	1296	NO	NO	NO	NO	<i>Xylella fastidiosa</i>	Xanthomonadaceae
NC_001383	pNKH43	1471	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Xanthomonadaceae
NC_004987	pXV64	1851	NO	NO	NO	NO	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Xanthomonadaceae

¹: La tabla resume los plásmidos aislados de g-Proteobacteria a los que se hace referencia en (Smillie et al. 2010).

²: Clasificación por PBRT. Los oligonucleótidos empleados en la simulación son los que se detallan en (Gotz et al. 1996), (Greated and Thomas 1999), (Krasowiak et al. 2002), (Carattoli et al. 2005), (Bahl et al. 2009), (García-Fernández et al. 2009), (Bertini et al. 2010), (Villa et al. 2010) y (Johnson et al. 2012). Se considera que los plásmidos son amplificables (“SI”) cuando los últimos 12 nucleótidos del extremo 3’ de ambos cebadores de una preja concreta son idénticos 100% a la diana (este requisito es muy laxo ; a juzgar por nuestra experiencia, se requiere una homología más extensa para una amplificación efectiva). En cualquier otro caso, consideramos que no se produciría amplificación (indicado con “NO”).

³: Familia MOB a la que pertenece una relaxasa. “NO” indica que el plásmido carece de relaxasa.

⁴: Subfamilia de una relaxasa concreta, como se explica en el texto al que corresponden las figuras 3.1.A.-G. “NO” indica que la relaxasa no fue asignada a ninguna subdivisión filogenética.

⁵: Nombre de la pareja de iniciadores DPMT que pueden amplificar una relaxasa. Asumimos que la amplificación ocurrirá (“SI”) cuando el núcleo degenerado de cada pareja de oligonucleótidos tenga el 100% de identidad con el correspondiente AND diana. Igualmente, “NO” indica que la amplificación no es posible, teóricamente, con ninguna pareja e iniciadores DPMT.

⁶: Huésped bacteriano en el que cada plásmido fue aislado por primera vez y su familia taxonómica correspondiente.

- Bahl MI, Burmolle M, Meisner A, Hansen LH, Sorensen SJ (2009) All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel epsilon subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* 62(2): 134-139.
- Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P et al. (2010) Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(10): 4168-4177.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL et al. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods* 63(3): 219-228.
- Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A (2009) Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 63(2): 274-281.
- Gotz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R et al. (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and environmental microbiology* 62(7): 2621-2628.
- Greated A, Thomas CM (1999) A pair of PCR primers for Incp-9 plasmids. *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 11): 3003-3004.
- Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H et al. (2012) Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.03.001>
- Krasowiak R, Smalla K, Sokolov S, Kosheleva I, Sevastyanovich Y et al. (2002) PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids. *FEMS microbiology ecology* 42(2): 217-225.
- Smillie C, Garcillan-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(3): 434-452.

Bibliografia

Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A (2010) Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65(12): 2518-2529.

Bibliografía

Tabla Suplementaria 2: Colección de aislados del Hospital Ramón y Cajal

Cepa ^b	Caracterización de replicones ^a			Caracterización de relaxasas ^f																			
	Incompatibilidad ^c	Tamaño ^d	Replicón ^e	OF11	OF12	OP11	OP12	OP131	OP14	OC11	OC12	OH11	OH12	OH2	OQ11	OQ12	Oqu	OP3	OP4	OP51	OP52	OP53	
TC1#3	IncFII	85	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#4	IncFII	120	FII+FIA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#5	IncFII	160	FII+FIA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TC1#6	IncFII	85	FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TC1#7	IncFII	80	FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TC1#8	IncFII	85	FII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#9	IncFII	110	FII+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#10	IncFII	150	FII+FIA+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#11	IncFII	150	FII+FIA+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
TC1#12	IncFII	120	FII+FIA+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#13	IncFII	110	FII+FIA+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
TC1#14	IncFII	200	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#15	IncFII	80	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#16	IncFIB	150	FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#17	IncFIIA	100	FIIA	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TC1#18	IncFIIA	165	FIIA	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TC1#19	IncFIIA	-	FIIA + K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#20	IncII	120+100	II (120)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#21	IncII	90	II	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#22	IncII	66	II+K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#23	IncII	76	II+F+FIA+FIB+B/O	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#24	IncII	60	II+K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
TC1#25	IncII	291	II + FIB + K + (A/C)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#26	IncII	100	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TC1#27	IncII-N	48	II + N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliografia

TC1#28	IncI1-like (+)	70	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TC1#29	IncI1-like (+)	120	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#30	IncI1	80+27	I1 (80kb)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#31	IncI1	339	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#32	IncI1	30	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#33	IncI1	-	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#34	IncI1	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#35	IncI1	60	I1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TC1#36	IncI1	100	I1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TC1#37	IncI1	100	I1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
TC1#38	IncL/M	50	L/M	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#39	IncL/M	170	L/M	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#40	IncHI2	260	HI2+Y	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#41	IncHI2	260+90	HI2+I1	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#42	IncHI2	280+120	HI2+FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#43	IncHI2	290	HI2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#44	IncHI2	290	HI2+Y	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#45	IncHI2	310	HI2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#46	IncHI2	320	HI2+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#47	IncHI2	300	HI2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#48	IncHI1	240	HI1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#49	IncP1-alfa	100+25?	P+I1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#50	IncP1-alfa	100	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#51	IncA/C ₂	180	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#52	IncA/C ₂	50	A/C	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TC1#53	IncA/C ₂	120	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#54	IncA/C	150	A/C	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#55	IncA/C	170	A/C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
TC1#56	IncA/C	220	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Bibliografia

TC1#57	IncN	40	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
TC1#58	IncN	40	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#59	IncN	40	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#60	IncN	40	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#61	IncN	135	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TC1#62	-	70	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TC1#63	-	70	Y+B/O	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#64	-	120	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#65	-	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#66	-	242	II+FIB+K+HII	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#67	-	85	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#68	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#69	-	27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#70	-	50	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#71	-	60	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#72	-	54	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#73	-	38	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#74	-	84	K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#75	-	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC1#76	-	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#78	-	297	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#79	-	258+228+152+113	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#80	-	318+172	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#81	-	128	FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#82	-	112	FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#83	-	120	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC1#84	-	35	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#1	FII	100	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#2	FII	100	FII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Bibliografia

TC2#3	FII	160	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
TC2#4	FII	160	FII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#5	FII	140	FII+FIA+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#6	FII	120	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#7	FII	130	FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#8	FII	110	FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#9	FII	110+40	FII+FIB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#10	FII	80	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#11	FII	80	FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#12	FII	80	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#13	FII	80	FII+K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#14	FII	-	FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#15	I1	170+90+40	I1+FII+FIB+Y+K	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	
TC2#16	I1	85+45	I1+FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
TC2#17	I1	90	I1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#18	I1	75	I1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
TC2#19	N	50	N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#20	N	35	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#21	A/C	230	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#22	A/C	140	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#23	A/C	50	A/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#24	FII+N	85+40	85(FII)+40(N)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#25	FII+N	80+55	80(FII)+55(N)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#26	FII+N	300+70+30	70(FII)+300(N)+30(N)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#27	FII+N	80	80(FII)+N+K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#28	FII+N	80	80(FII)+N+K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#29	FII+N	-	FII+N	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TC2#30	FII+A/C	150+80	150(A/C)+80(FII)+K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TC2#31	K-I1	150+80+50	I1+FII+FIB+Y+K	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliografía

TC2#32	I1+N	90+35	I1+N+K	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#33	I1+N	90+35	I1+N	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#34	FII + K	100	FII + K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#35	FII + K	70	FII + K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#36	FII + K	70	FII + K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#37	-	190+160+90	I1+FIB+FII+K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#38	-	230+85	I1+FIB+FII+K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TC2#39	-	290+35	I1+FIB+FII+K	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#40	-	100+9	I1+FIB+FII+K	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#41	-	55+25	I1+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
TC2#42	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#43	-	175	I1+P+K+FII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TC2#44	-	100	K+B/O	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TC2#45	-	160	K+FIB+FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#46	-	90	I1+FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#47	-	90	FII	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#48	-	90	K+B/O+F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#49	-	130+100+50+40	L/M+FIB+FII	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#51	-	125+55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#52	-	130+40	I1+B/O+F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC2#53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#54	-	80	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TC2#55	-	80	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				13	60	4	39	6	0	0	1	13	10	0	0	5	11	3	7	71	0	3

- a) La caracterización de replicones fue llevada a cabo por el laboratorio de la Dra. Teresa Coque
 b) Designación de la cepa analizada en cada colección
 c) Grupo de incompatibilidad de cada una de las cepas. Un - en la casilla indica que no se conoce el grupo de pertenencia.
 d) Tamaño de los plásmidos contenidos en cada aislado clínico. El - indica que se desconoce el tamaño.
 e) Replicón amplificado por medio del esquema PBRT. Un - indica que no se ha podido amplificar replicón alguno.
 f) La caracterización por DPMT se realizó como se indica en la sección 2. Un - indica amplificación negativa y un + implica amplificación positiva.

Bibliografía

Tabla Suplementaria 3. Colección Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Cepa ^b	Caracterización de replicones ^a			Caracterización de relaxasas ^f																		
	Incompatibilidad ^c	Resistencia ^d	Replicón ^e	OF11	OF12	OP11	OP12	OP131	OP14	OC11	OC12	OH11	OH12	OH2	OQ11	OQ12	Oqu	OP3	OP4	OP51	OP52	OP53
SP#1	IncA/C, repFIIA	CMY-2	A/C+FIIA	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-		-	+			
SP#8	IncA/C, IncFIIA, IncFIB	CMY-2	A/C+FIIA+FIB	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	-		-	-			
SP#11	IncA/C, IncI	CMY-2	A/C+I	-	-	+	+	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#18	IncA/C, IncF, repFIIA, repFIB	CMY-2	A/C+F+FIIA+FIB	-	-	+	-	-	-		-	-	+	-	-	-		-	-			
SP#20	IncA/C, IncI	CMY-2	A/C+I	-	-	+	-	-	-		-	-	+	-	-	-		-	-			
SP#24D	IncA/C, IncT, IncB/O, IncI, IncF(+/-), repFIB	CMY-2	A/C+T+B/O+I+F+FIB	-	-	-	+	-	-		-	-	+	-	-	-		-	-			
SP#25	-	ACC-1	-	+	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#27D	IncA/C, IncT	CMY-2	A/C+T	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#33D	IncF, IncFIB	CMY-40	F+FIB	+	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#34D	IncF	CMY-4	F	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#42	-	ACC-1	-	+	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#44D	-	CMY-2+BL	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#46	-	CMY-2	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#48	IncI	CMY-2	I	-	-	+	+	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#49D	IncA/C, IncB/O, IncF, repFIB	CMY-2	A/C+B/O+F+FIB	-	-	-	+	-	-		-	-	+	-	-	-		-	-			
SP#56	IncI, IncF, IncK	CMY-2	I+F+K	-	-	+	+	-	-		-	-	-	-	-	+		-	-			
SP#58	IncI, IncK, IncB/O	CMY-2	I+K+B/O	-	-	+	+	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#59	IncI, IncK, IncB/O, IncY	CMY-2	I+K+B/O+Y	-	-	+	+	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#60	IncF, IncY	CMY-27	F+Y	-	+	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#65D	-	CMY-25	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			

Bibliografía

SP#1E	IncHI2	VIM+BL.	HI2	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-		-	-			
SP#3E	-	VIM	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	+			
SP#4E	IncHI2	VIM+BL.	HI2	-	-	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-		-	+			
SP#6E	-	VIM	-	-	+	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-			
SP#8E	-	VIM	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-		-	-			
SP#9E	IncHI2, IncF	VIM+BL.	HI2+F	-	+	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-		-	-			
SP#11E	IncHI2	VIM+BL.	HI2	-	+	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-		-	-			
SP#3.08	-	VIM	-	+	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-		-	+			
SP#5.08	-	VIM	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		-	+			
SP#7.08	-	VIM+BL.	-	+	-	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-		-	+			
				7	6	27	17	8	0		2	5	7	0	0	2		0	6			

- a) La caracterización de replicones fue llevada a cabo por el laboratorio del Dr. Ferrán Navarro.
- b) Designación de la cepa analizada en cada colección.
- c) Grupo de incompatibilidad de cada una de las cepas. Un - en la casilla indica que no se conoce el grupo de pertenencia.
- d) Tipo de beta-lactamasa que contiene cada aislado clínico analizado.
- e) Replicón amplificado por medio del esquema PBRT. Un - indica que no se ha podido amplificar replicón alguno. Un (+/-) indica una amplificación ambigua del replicón.
- f) La caracterización por DPMT se realizó como se indica en la sección 2. Un - indica amplificación negativa y un + implica amplificación positiva. Las columnas grises corresponden a aquellas parejas de cebadores que no fueron utilizados en el análisis de esta colección.

Bibliografía

Tabla Suplementaria 4. Colección Universidad Autónoma de Barcelona

Cepa ^b	Caracterización de replicones ^a				Caracterización de relaxasas ^g																		
	b-lactamasa ^c	Resistencia a no β-lactámicos ^d	Número ^e	Tamaño ^f	OF11	OF12	OP11	OP12	OP131	OP14	OC11	OC12	OH11	OH12	OH2	OQ11	OQ12	Oqu	OP3	OP4	OP51	OP52	OP53
UAB#1	CTX-M-14a	-	2	94/47	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#2	CTX-M-14a	-	2	100/55	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#3	CTX-M-9	Sul, Sxt, Tmp	2	178/59	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#4	CTX-M-10	Sss, Sxt, Tmp	3	356/77/49	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#5	TEM-52	-	1	45	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#6	CTX-M-14a	-	2	171/99	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#7	SHV-12	-	1	87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
UAB#8	CTX-M-14a	-	2	102/50	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#9	CTX-M-14a	Sul, Sxt, Tmp	2	113/35	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#10	CTX-M-14a	-	2	114/46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#11	SHV-12	-	2	83/38	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#12	CTX-M-14a	Kan, Sul, Sxt, Tmp	1	130	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#13	CTX-M-14a	-	2	105/55	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#14	SHV-12	-	1	98	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UAB#15	CTX-M-14(b)	C, Tmp, Sss, Sxt	2	32,1/101,2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
UAB#16	CTX-M-14a	-	2	96/52	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
					1	1	9	11	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	11	0	0

a) La caracterización de replicones fue llevada a cabo por el laboratorio de la Dra. Montserrat Llagostera.

b) Designación de la cepa analizada en cada colección.

c) Tipo de beta-lactamasa que contiene cada aislado clínico analizado.

d) Otras resistencias que acompañan a la anterior.

Bibliografía

- e) Número de plásmidos detectados en el transconjugante analizado.
- f) Tamaño de los plásmidos de cada transconjugante.
- g) La caracterización por DPMT se realizó como se indica en la sección 2. Un - indica amplificación negativa y un + implica amplificación positiva.

Bibliografía

Tabla Suplementaria 5. Colección Universidad Autónoma de Barcelona

Cepa ^b	Caracterización de replicones ^a				Caracterización de relaxasas ^g																		
	Incompatibilidad ^c	Grupo ^d	Número ^e	Tamaño ^f	OF11	OF12	OP11	OP12	OP131	OP14	OP3	OP4	OP51	OP52	OP53	OQ11	OQ12	Oqu	OH11	OH12	OH2	OC11	OC12
V1#1	FIB, FIA, repF, II-I, ColE	D	4	100, 70, 40, 6	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#2	II-I, ColE		3	100, 40,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#3	FIB, FIA, repF, II-I, ColE	B2	5	150,90, 40,6,3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#4	FIB,II-I, ColE		3	140,40,3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#5	FIB,repF, ColE		1	90	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#6	FIB,II-I, ColE		3	140,40,3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#7	FIA, FIB, repF, II-I, ColE	B1	3	140;130;6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#8	II-I		1	130	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#9	II-I,FIB,FIA		1	152	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#10	FIB, repF, II-I, ColE	D	5	110, 100, 10, 6, 3	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#11	II-I, ColE		4	100, 10, 6, 3	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#12	II-I, ColE		4	100, 10, 6, 3	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#13	FIB, FIA, P, K, B/O, ColE	D	2	120, 100	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#14	FIB,P,K, ColE		1	120	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#15	FIA, FIB, repF, B/O, ColE	A	3	120,80,7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#16	B/O		2	120, 80	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#17	FIA/FIB,repF		2	120, 80	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#18	FIB, repF, II-I, B/O, ColE	D	3	120, 100, 30	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Bibliografía

V1#19	II-I		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#20	II-I		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
V1#21	II-I, ColE	A	3	100, 6,3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#22	II-I		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#23	FIA, FIB, repF, ColE	A	3	120, 10,5	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#24	FIA,FIB,repF		1	120	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#25	FIA,FIB,repF		1	120	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#26	FIA, FIB, repF, ColE	A	5	170,110, 80, 40, 10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#27	FIA,FIB,repF, ColE		2	170, 100	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#28	FIA,FIB,repF, ColE		1	170	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#29	FIB, FIA, repF, A/C, ColE	B2	4	160,60,50,6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
V1#30	FIB,FIA,repF		3	160, 70,50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#31	FIB,FIA,repF		3	160, 70,50	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#32	FIB,FIA,repF, ColE		2	160, 50	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#33	FIB, repF, A/C, ColE	B1	4	170,140,100,50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V1#34	A/C		1	170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V1#35	A/C		1	170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V1#36	FIB, repF, II-I, A/C, ColE	B2	4	170,160,100,10	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V1#37	FIB,repF, ColE		2	160, 10	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V1#38	A/C, ColE		2	170, 10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
V3#1	FIB, Frep, K, B/O	i	3	170,100,60	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Bibliografija

V3#2	K,B/O		2	100, 60	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#3	FIB, Frep, K, B/O, ColE	i	2	140, 100	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#4	K,B/O, Frep		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#5	FIB, FIA, Frep, K, B/O	i	2	170, 100	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#6	K,B/O		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#7	FIB, Frep, K, ColE	i	4	140,130, 100	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#8	K, Frep		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#9	K,B/O	i	1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#10	K,(B/O)		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#11	FIB, Frep, K, B/O, I1-I, ColE	i	3	160,100;3,9;4	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#12	K,B/O		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#13	FIB, Frep, P, I1-I, ColE	i	1	140	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#14	I1-IP		1	140	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#15	FIB, Frep, B/O	i	3	110,100,7	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#16	FIB		1	110	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#17	FIB, Frep, K, B/O, ColE	i	6	170,100,90,60,40,6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#18	K,B/O,FIB,Frep, ColE		3	100,90,60	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#19	FIB, Frep, K, (B/O), ColE	i	3	170,100,40	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#20	K,(B/O)		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#21	FIA, FIB, Frep, K, B/O, ColE	i	3	110,100,40	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#22	K,B/O		2	100, 40	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliografía

V3#23	FIB, Frep, II-I	i	2	100;60	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#24	II-I		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#25	FIB,Frep,P, II-I, ColE	i	3	140;6;3	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#26	II-I,P, ColE		2	140;3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#27	FIB, Frep, K, (B/O), II-I, ColE	i	3	140;100;6,4	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#28	K,(B/O)		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#29	FIB, FIA, Frep, K, B/O, ColE	i	6	170,100;7;6;3,9	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#30	K,B/O, ColE		3	100;7;6	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#31	FIB, Frep, K, ColE	i	3	170,100,40	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#32	FIB,K,Frep		2	100, 40	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V3#33	FIA,K,B/O, ColE	i	2	170, 100	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3#34	K,B/O		1	100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3#35	FIA, Frep, K, II-I	i	6	170,110,100;50;6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3#36	II-I,K, Frep		2	110, 100	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3#37	FIB, Frep, II-I, ColE	i	4	170, 100, 6,5,	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3#38	FIB,II-I, ColE		2	100, 6,5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					1	44	3	57	0	0	6	0	19	0	0	0	0	15	1	6	0	0	1

- a) La caracterización de replicones fue llevada a cabo por el laboratorio del Dr. Luís Martínez.
 b) Designación de la cepa analizada en cada colección. Las cepas están agrupadas por relacionarse como cepas Donantes y Transconjugantes.
 c) Grupo de incompatibilidad de cada una de las cepas. Un - en la casilla indica que no se conoce el grupo de pertenencia.
 d) Grupo al que pertenece cada cepa aislada. Los i corresponden con cepas en las que no se dispone de esta información. Esta característica no se clasificó en los Transconjugantes.
 e) Número de plásmidos detectados cada aislado analizado.
 f) Tamaño de los plásmidos de cada transconjugante.
 g) La caracterización por DPMT se realizó como se indica en la sección 2. Un - indica amplificación negativa y un + implica amplificación positiva.

Bibliografía

Tabla Suplementaria 6. Colección de cepas de *Escherichia coli*, aisladas de infecciones urinarias (Hospital Umeå)

Cepa ^b	Caracterización de replicones ^a					Caracterización de relaxasas ^c																			
	F_rep	I1	HI1	W	X	OF11	OF12	OP11	OP12	OP131	OP14	OP3	OP4	OP51	OP52	OP53	OQ11	OQ12	Oqu	OH11	OH12	OH2	OC11	OC12	
A#3031	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3355	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3391	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3560	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3836	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3984	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-
A#4371	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+
A#3097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3323	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+
A#3632	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3652	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3942	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+
A#3062	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3358	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3449	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-
A#3033	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-
A#3065	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bibliografía

A#3665	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	+	-
A#3671	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#3718	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#3995	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#3468	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#3100	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#3450	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
A#4393	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
	31	3	1	0	2	0	30	2	6	0	0	7	0	18	0		0	0	4	1	0	0	3	6

a) La caracterización de replicones fue llevada a cabo por el laboratorio de la Dra. Ellen Zechner.

b) Designación de la cepa analizada en cada colección.

c) La caracterización por DPMT se realizó como se indica en la sección 2. Un - indica amplificación negativa y un + implica amplificación positiva. La columna gris corresponde a aquella pareja de cebadores que no fue utilizada en el análisis de esta colección.

**Nota referente a las secuencias de ADN a las que se hace alusión en la presente
Memoria**

Dada la imposibilidad e inutilidad de añadir como material impreso las secuencias de ADN obtenidas durante la realización de estos trabajos (tanto por su longitud como porque perderían una gran cantidad de información adicional) se ha optado por adjuntar toda esta información como archivos de tipo FASTA, legibles por cualquier visor de secuencias de ADN, como VectorNTI y similares.