



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Tesis de grado en la Licenciatura en Ciencias Biológicas

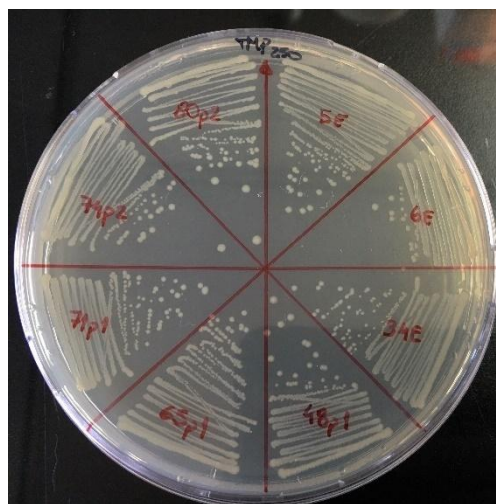
Profundización Microbiología

**“Caracterización fenotípica y genotípica de la
resistencia a trimetoprim en *Escherichia coli*
uropatógeno”**

Diego Aznárez Torrendell

Tutora: Magela D. Laviña Uriarte

Sección Fisiología & Genética Bacterianas, Facultad de Ciencias



**Montevideo, Uruguay
2020**

Tribunal

1. Dra. Gabriela García Gabarrot. Responsable del Sector Infecciones Respiratorias. Unidad de Bacteriología. Departamento de Laboratorios de Salud Pública.
2. Dra. Silvia Batista Córdoba. Grupo Microbiología Molecular – Departamento BIOGEM, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).
3. Dra. Magela Laviña Uriarte. Sección Fisiología y Genética Bacterianas, Facultad de Ciencias.

Agradecimientos

A mi familia, especialmente a mis padres, por todo el apoyo brindado y esfuerzo realizado para darme la mejor educación posible.

A mi tutora, Magela, quien desde el día uno de comenzado el estudio tuvo gran dedicación e interés por el mismo, transmitiendo tanto sus conocimientos en microbiología así como su pasión por su trabajo como investigadora.

A toda la Sección Fisiología y Genética Bacterianas de la Facultad de Ciencias: Magela Laviña, Fernanda Azpiroz, Eloisa Poey, Alicia Parente, Eliana de los Santos y Valeria Florez por sus aportes y apoyos al trabajo; estando siempre dispuestas a ayudar, lo que muestra su gran profesionalismo así como su calidad humana.

Por último, a los amigos que me deja esta carrera, por su compañía y apoyo en todos estos años, especialmente Agustín, María Pía, Nicasio y Lucas.

Resumen

Las bacterias resistentes a antibióticos representan un problema a nivel mundial puesto que limitan las opciones de tratamiento de enfermedades infecciosas. Los genes de resistencia antibiótica suelen estar portados por elementos genéticos móviles, generalmente plásmidos. Muchos de estos últimos pueden ser transferidos horizontalmente por conjugación, favoreciendo la diseminación de las resistencias y contribuyendo a la aparición de clones multirresistentes. Además, los integrones de clase 1 y 2 son también responsables de este fenómeno por ser elementos genéticos que portan genes de resistencia. La multirresistencia ha sido particularmente reportada en Gram negativos, siendo un ejemplo ya clásico de estudio *Escherichia coli* uropatógeno (UPEC), que es el agente etiológico de más del 80% de las infecciones urinarias. Entre los principales antibióticos utilizados para su tratamiento están aquellos que bloquean la vía del ácido fólico: sulfamidas y trimetoprim (TMP), que actúan inhibiendo dos pasos distintos de esta vía. La combinación de estos dos en el compuesto co-trimoxazol (SXT) es la utilizada clínicamente y actúa como agente bactericida. En Gram negativos, las resistencias más frecuentes a estos compuestos se deben a genes del genoma flexible: *sul* de resistencia a sulfamidas y *dfrA* de resistencia a TMP. En este trabajo se estudió la resistencia a TMP en una colección de 43 cepas de UPEC. En primer lugar, se determinó el fenotipo de resistencia a TMP y a la sulfamida sulfametoxazol (SMX) por separado, así como a su formulación combinada de SXT. Luego se buscaron las variantes más frecuentes en *E. coli* de los genes *dfrA* primero in silico en banco de datos y luego experimentalmente por PCR en la colección. También se estudió la relación de estos genes con la presencia de integrones de clase 1 y 2. Finalmente se realizaron experimentos de conjugación para estudiar la transferencia horizontal de la resistencia a TMP entre cepas de *E. coli*. Nuestros resultados indicaron que son necesarias ambas resistencias fenotípicas individuales, a SMX y a TMP, para conferir fenotipo de resistencia a SXT. Se encontró una muy alta asociación entre la resistencia a TMP y la resistencia a SMX, así como también con la presencia de integrones de clase 1 y 2. Los genes *dfrA* analizados mediante PCR fueron nueve, de los cuales siete se encontraron en 22 cepas de la colección, todas resistentes a TMP. El más frecuente fue el *dfrA1* con 11 apariciones y asociado al integrón de clase 2 en el 89% de los casos. En los experimentos de conjugación ocho cepas de UPEC transfirieron su resistencia a TMP a una *E. coli* K12. En suma, este trabajo realiza aportes a la noción de que existiría una estrecha vinculación entre las resistencias a TMP y a SMX, así como también entre éstas y los integrones de clase 1 y 2. Además, se constató que más del 80% de las cepas portadoras de genes *dfrA*, fueron multirresistentes.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	8
	II.1. Objetivo general.....	8
	II.2. Objetivos específicos.....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
	III.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	9
	III.2. Determinación de resistencias antibióticas.....	10
	III.3. Análisis in silico/bioinformático.....	11
	III.4. Análisis genético por PCR.....	11
	III.5. Experimentos de conjugación.....	13
IV.	RESULTADOS.....	15
	IV.1. Resistencias antibióticas de las cepas de UPEC.....	14
	IV.1.1. Corroboración de resistencias.....	14
	IV.1.2. Resistencias a inhibidores de la vía del ácido fólico.....	15
	IV.2. Análisis bioinformático de los genes <i>dfrA</i> en <i>E. coli</i>	18
	IV.3. Análisis genético por PCR.....	20
	IV.3.1. Diseño de cebadores.....	20
	IV.3.2. Detección de genes <i>dfrA</i>	22
	IV.4. Conjugaciones de cepas de UPEC con <i>E. coli</i> K12.....	25
V.	DISCUSIÓN.....	27
VI.	CONCLUSIONES.....	31
VII.	PERSPECTIVAS.....	31
VIII.	REFERENCIAS.....	32

I. Introducción

Las bacterias resistentes a antibióticos representan un gran problema a nivel mundial. Las infecciones generadas por éstas pueden limitar las opciones de un tratamiento efectivo y están asociadas en muchos casos a un incremento de morbilidad y mortalidad. Es sabido que el aumento de las resistencias antibióticas está directamente relacionado con el uso de drogas antimicrobianas, dando lugar a la aparición del fenómeno de la multirresistencia, que es la resistencia simultánea a varios antibióticos en una cepa bacteriana. Este concepto ha sido precisado por algunos autores como resistencia adquirida a por lo menos un agente de tres o más familias distintas de antibióticos (Partridge, 2011). Los análisis moleculares revelaron que la prevalencia aumentada de la multirresistencia se ha generado mediante la adquisición de genes preexistentes, seguida por su amplificación en respuesta a la selección ejercida por el uso de los antibióticos. En esta misma línea, la co-resistencia juega un papel importante en este aumento ya que al seleccionar con un tratamiento una resistencia en particular, indirectamente se están seleccionando las demás resistencias portadas por dicha cepa. La adquisición, acumulación y diseminación de genes de resistencia se debe en gran medida a la presencia de elementos genéticos móviles, que son elementos que promueven la movilidad intracelular o intercelular de segmentos de ADN. Como agentes principales de esta movilidad se destacan los plásmidos, que son moléculas de ADN extra cromosómico autorreplicativas. Además de su capacidad de ser heredados verticalmente, muchos plásmidos pueden promover su transferencia horizontal, lo que los hace importantes vehículos de diseminación de otros elementos genéticos móviles y de genes de resistencia. Este conjunto de propiedades les permite generar rearrreglos dentro de un mismo plásmido, entre distintos plásmidos, o entre el cromosoma y plásmidos; fenómeno que ha sido reportado tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas (Partridge et al., 2005; Bryce et al., 2016; Mulder et al., 2019).

Las bacterias Gram negativas difieren de las Gram positivas en la estructura de la pared celular, generando diferencias en la penetración y retención de agentes químicos. Las Gram negativas tienen una envoltura compuesta por 3 capas: una membrana externa, una capa de peptidoglicano y una membrana interna. Las Gram positivas tienen hipertrofiada la capa de peptidoglicano y carecen de la membrana externa, característica que determina su susceptibilidad diferencial frente a ciertos antibióticos. Como la membrana externa cumple función de barrera, sobre todo como un filtro, las moléculas antibióticas de mayor tamaño no pueden ingresar en los Gram negativos. Los antibióticos que atacan ambos grupos, Gram positivos y negativos, se llaman de amplio espectro (Partridge, 2011).

La resistencia a antibióticos en Gram negativos se debe mayormente a genes de resistencia pertenecientes al denominado genoma flexible, que generalmente se localiza en plásmidos. Es así que estos genes suelen ser transferibles horizontalmente, aumentando sus vías de diseminación y las posibilidades de juntarse con otros y generar clones multirresistentes. En cambio, en los Gram positivos es más frecuente que las resistencias se deban a cambios genéticos en el genoma básico, muchas veces por mutaciones puntuales que afectan la diana de acción de los antibióticos, por lo que su dispersión horizontal está más acotada (Woodford, 2005; Partridge, 2011).

Dentro de los Gram negativos, las enterobacterias, principalmente la especie *Escherichia coli*, se encuentra entre las bacterias más frecuentemente afectadas por el fenómeno de la multirresistencia (Partridge, 2011). *E. coli* se encuentra asociada a la flora intestinal de humanos y vertebrados en general. Es una de las especies bacterianas más estudiadas, de la cual se tiene gran conocimiento sobre su estructura, metabolismo, fisiología y genética. Es un buen modelo de estudio ya que es de fácil acceso y es cultivable en laboratorio, además es de rápido crecimiento, con un tiempo generacional que puede ser tan corto como de 20 min. Esta especie abarca una gran variedad de cepas, muchas comensales, otras enteropatógenas y aún otras que son patógenas extraintestinales, entre las que se encuentran las uropatógenas. Esto revela que esta especie tiene una gran plasticidad genética con una gran capacidad de variación de su genoma flexible (Neidhardt & Curtiss, 1996; Kaper et al., 2004; Partridge 2011). *E. coli* uropatógeno (UPEC) es el principal agente etiológico de las infecciones del tracto urinario (UTI). Las cepas causantes de UTI tienen un tropismo especial por el tracto urinario y son un buen modelo para estudiar patogenicidad porque causan infecciones en un aparato normalmente estéril, por lo que se obtienen prácticamente puras en urocultivo. Las UTI son una de las infecciones bacterianas más comunes en la atención médica primaria. UPEC es responsable de causar más del 80% de las mismas. Estudios realizados en UPEC sobre virulencia y filogenia demostraron que son un grupo ampliamente heterogéneo: diferentes cepas pueden generar el mismo síndrome, por lo que no ha sido posible la identificación de patotipos (Poey et al., 2012; Bryce et al., 2016).

Se han detectado fenómenos de multirresistencia en *E. coli* en general y en UPEC en particular, reflejo del uso de la antibioterapia (Partridge, 2011). Entre los antibióticos que han sido ampliamente usados para tratar las UTI se encuentran aquellos que inhiben la síntesis del ácido fólico. El ácido fólico es una vitamina necesaria para la biosíntesis de compuestos celulares en todas las células. Las bacterias pueden sintetizarlo de novo, ya que cuentan con todas las enzimas necesarias para su síntesis. Por el contrario, los eucariotas como los mamíferos no lo sintetizan y por lo tanto dependen de un suministro nutricional de este compuesto, para lo cual disponen de un sistema de transporte activo de membrana para captarlo directamente de la dieta. El hecho de que la vía de síntesis del

ácido fólico se encuentre presente en bacterias y no en animales superiores la hizo blanco de drogas antimicrobianas de uso terapéutico (Cortés et al., 2000; Sköld, 2001; Birmingham y Derrick, 2002). La vía del ácido fólico involucra tres enzimas que actúan secuencialmente: dihidropteroato sintasa (DHPS), dihidrofolato sintasa (DHFS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) codificadas por los genes *folP*, *folC* y *folA* respectivamente (Figura 1) (Neidhardt & Curtiss, 1996).

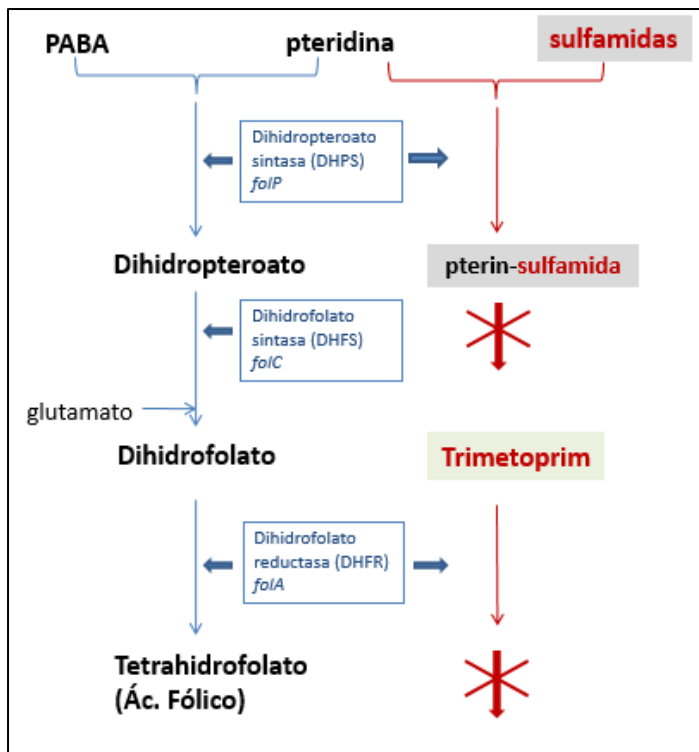


Figura 1. Vía de síntesis del ácido fólico y sus inhibidores. En negro, los intermediarios metabólicos que conducen a la síntesis de tetrahidrofolato, también llamado ácido fólico. (PABA, ácido para-aminobenzoico). En azul, las enzimas participantes de la vía y los genes que las codifican. En rojo, los inhibidores de la vía y su sitio de acción.

Dos de las enzimas de esta vía, la primera (DHPS) y la última (DHFR), son blanco de antibióticos que inhiben la síntesis del ácido fólico. Se trata de los compuestos sintéticos sulfamidas y trimetoprim (TMP). Las sulfamidas comprenden una familia de compuestos estructuralmente similares que inhiben la enzima DHPS, siendo el sulfametoxazol (SMX) uno de los más utilizados. Por su parte, el TMP inhibe la DHFR. Ambos tipos de compuesto actúan como análogos metabólicos compitiendo con los sustratos naturales de las enzimas que inhiben (Figura 1). El efecto individual de ambos antibióticos es bacteriostático; sin embargo, el efecto sinérgico de combinar TMP con sulfamidas lleva al tratamiento efectivo de muchas infecciones (Huovinen, 1987). Concretamente, la combinación de SMX con TMP es de gran uso en la clínica, formando el compuesto conocido como co-trimoxazol (SXT), que actúa como antibiótico de amplio espectro.

Las sulfamidas fueron introducidas en el uso clínico en la década de 1930, pero su uso masivo se vio rápidamente restringido por la frecuente aparición de resistencias en bacterias patógenas. Las

resistencias cromosómicas a la droga se deben a mutaciones en el gen *folP*, que codifica para la DHPS, disminuyendo su afinidad por las sulfamidas y en favor de su unión al sustrato natural PABA. En Gram negativos la resistencia a sulfamidas suele deberse a enzimas resistentes adicionales con actividad dihidropteroato sintasa, que son codificadas por genes portados en el genoma flexible, generalmente en plásmidos. Se conocen tres DHPS resistentes: Sul1, Sul2 y Sul3 que son codificadas por los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, respectivamente (Figura 2). Los dos primeros aparecen frecuentemente en muestras clínicas, una explicación a este fenómeno es que pueden estar localizados en vehículos de diseminación muy eficientes como plásmidos, transposones e integrones. Por ejemplo, el gen *sul1* se ha encontrado relacionado con otros genes de resistencia en integrones de clase 1 (Huovinen, 2001; Sköld, 2001).

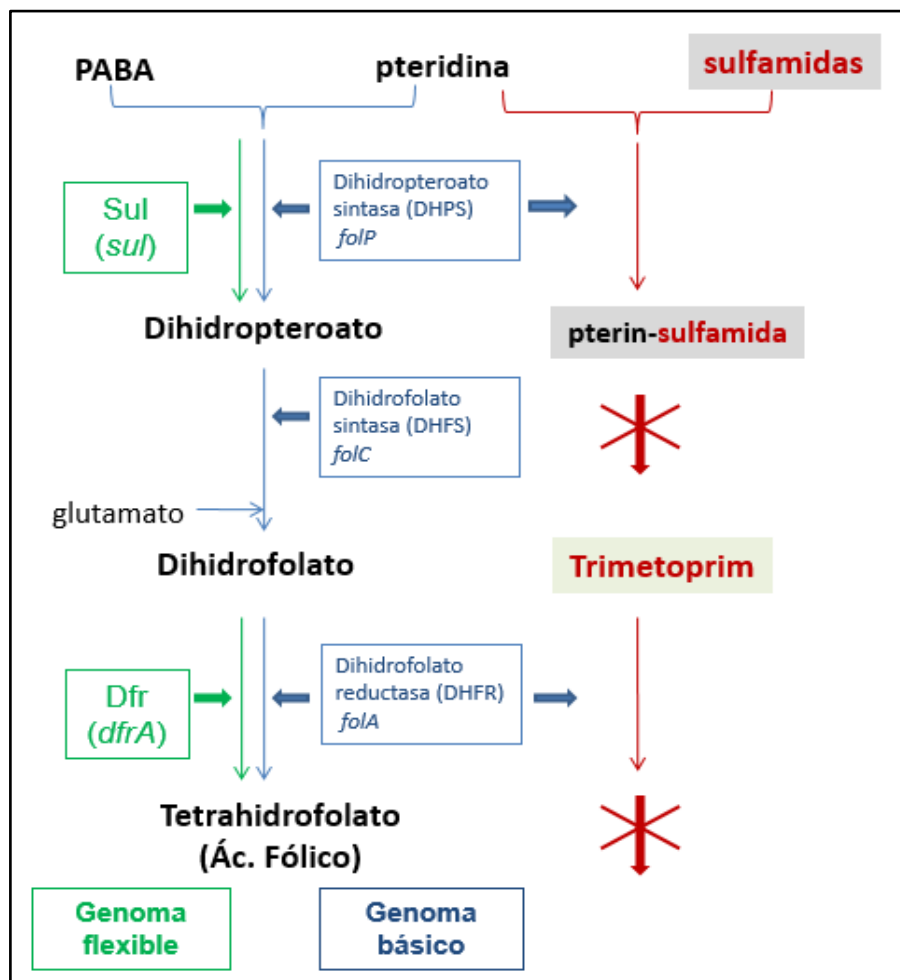


Figura 2. Intervención de enzimas resistentes a los inhibidores de la vía del ácido fólico. Enzimas Sul, dihidropteroato sintasas resistentes a sulfamidas, que refuerzan/suplantán el primer paso de la vía; enzimas Dfr, dihidrofolato reductasas, resistentes a TMP, que refuerzan/suplantán el tercer y último paso de la vía.

El TMP es un agente bacteriostático que comenzó a utilizarse clínicamente a finales de la década de 1960. Su uso masivo también llevó al rápido desarrollo de resistencias. A pesar de ser un tema relativamente poco estudiado, se conocen distintos mecanismos de resistencia al TMP. Uno de ellos se debe a mutaciones en el gen *folA* cromosómico que codifica para la enzima DHFR, que puede resultar en la hiperproducción de la enzima o generar una variante resistente. Otro mecanismo consiste en la producción de enzimas no susceptibles al TMP, adicionales a la DHFR cromosomal. Estas enzimas (Dfr) suelen estar codificadas por genes *dfr* o *dfrA* que son portados por el genoma flexible, por plásmidos o por el cromosoma cuando éstos se integran al mismo (Figura 2). Este es el mecanismo más común de resistencia a TMP en bacterias Gram negativas (Huovinen, 1987; Shin et al., 2015) y también ha sido reportado en Gram positivos (Woodford, 2005).

Se piensa que el uso del SXT promovió la aparición de co-resistencias a TMP y SMX por separado, mediadas por los genes *dfrA* y *sul*, respectivamente, o, en menor frecuencia, por mutaciones cromosómicas (Sköld, 2001). En general las enzimas Dfr deben su resistencia al TMP por modificaciones en su sitio activo. Al momento, se conocen al menos 35 variantes de genes *dfrA* (nombrados *dfrA1*, *dfrA2*,...) y la lista sigue en aumento. Se han hecho estudios filogenéticos de estos genes que muestran su gran diversidad y dispersión. Muchos de ellos se han encontrado asociados a unos elementos genéticos llamados integrones (Sköld, 2001; Lee et al., 2001; Sköld, 2010; Shin et al., 2015).

Los integrones son elementos genéticos que tienen un sistema de recombinación específica de sitio capaz de integrar y expresar marcos abiertos de lectura contenidos en estructuras modulares llamadas casetes génicos. Su sistema de recombinación específica de sitio es característico ya que no reconoce un único sitio, sino una familia de sitios, lo que genera que haya una enorme cantidad de genes capaces de ser movilizados, rearrreglados y diseminados por los integrones. La estructura básica de un integrón comprende un gen que codifica para una integrasa (IntI) específica de sitio, *intI*, un sitio adjunto en el cual se insertan los casetes génicos, *attI*, y un promotor que expresa los casetes génicos insertados, *Pc*. Un casete génico es un elemento independiente no replicativo que contiene un gen sin promotor y un sitio de recombinación, *attC*, reconocido por la integrasa IntI. Existen distintas clases de integrones siendo los de clase 1 y 2 los vinculados con resistencias antibióticas (Labbate et al., 2009; Cambray et al., 2010; Ramírez et al., 2010).

Los integrones de clase 1 (Int1) son los más extendidos globalmente y los de mayor importancia clínica, ya que tienen una alta prevalencia en aislamientos clínicos de Gram negativos. Los Int1 pueden estar localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos, que suelen conjugativos, es decir, que pueden ser transferidos horizontalmente a otras bacterias en comunidades microbianas.

Son grandes contribuidores a la aparición de clones Gram negativos multirresistentes, distribuyéndose mayormente entre cepas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae* (Zhang et al., 2018). Tienen segmentos de ADN conservados que flanquean la región variable de los casetes génicos: en el extremo 5' se encuentran el gen para la integrasa 1 (IntI1) *intl1*, el sitio adjunto *attI* y el promotor *Pc*; en el extremo 3' están el gen *qacEΔ*, que codifica para resistencia a compuestos de amonio cuaternario, y el gen *sul1*, que confiere resistencia a sulfamidas (Figura 3 A). El contenido variable de estos integrones consiste de pocos genes de resistencia, usualmente uno o dos, que tienden a ser repetitivos, siendo los más frecuentes los que codifican para resistencia a TMP y estreptomina (STR). Estos elementos exhiben plasticidad genética, por lo que su carga de resistencia puede diferir, un hecho que sin duda proporciona a las bacterias hospederas nuevas oportunidades para adaptarse a los entornos cambiantes. Dicha plasticidad se debe a la estructura del integrón: La integrasa no solo es capaz de reclutar nuevos casetes génicos dentro de la región variable, sino que también rearregla aquellos insertados, de manera que puedan cambiar de orden o ser perdidos. Los plásmidos que llevan un Int1 son verdaderos plásmidos R (de resistencia), llevando un conjunto de resistencias antibióticas más diverso que coexisten con el integrón pero se localizan fuera de este. Esto hace que el Int1, además de aportar algunas resistencias, sea considerado como un verdadero marcador de grandes loci de multirresistencia. Las mismas variantes del Int1 fueron halladas en distinto tiempo, países y especies, lo que ha llevado a asumir que el Int1 tendría una gran capacidad de diseminación horizontalmente en poblaciones bacterianas (Labbate et al., 2009; Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019; Cambray et al., 2010; Ramírez et al., 2010).

Por su parte, los integrones de clase 2 (Int2), a pesar de que también se suelen encontrar en plásmidos conjugativos y son grandes contribuidores al problema de la multirresistencia en bacterias, son menos prevalentes que los de clase 1 en muestras clínicas. Esto probablemente se debe a que, en la mayoría de los casos, el gen *intl2* para la integrasa 2 (IntI2) se encuentra inactivado por una mutación que genera un codón de terminación. Por lo tanto, estos Int2 han perdido la capacidad de integrar nuevos casetes génicos siendo así menos diverso que los de clase 1. El Int2 más extendido mundialmente lleva los casetes génicos *dfrA1*, que confiere resistencia a TMP, *sat2*, que confiere resistencia a estreptomina, y *aadA1*, que confiere resistencia a STR (Figura 3 B) (Labbate et al., 2009; Cambray et al., 2010; Ramírez et al., 2010).

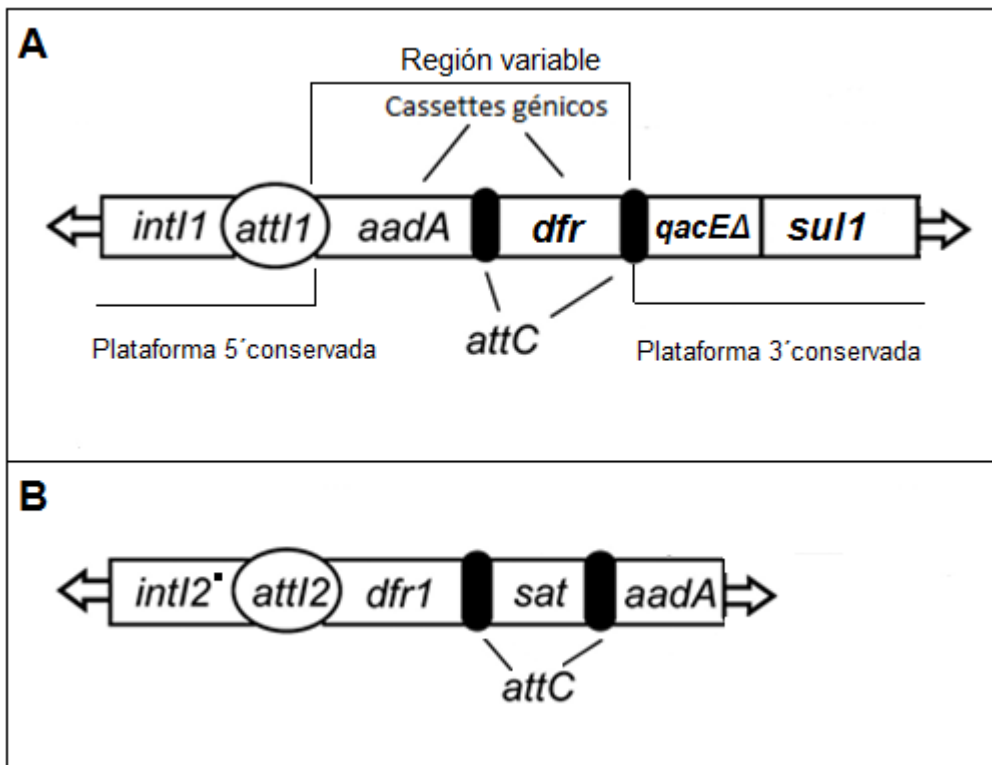


Figura 3. Integrones vinculados a las resistencias antibióticas. A) Estructura básica de un integrón de clase 1 con dos de los cassetes génicos más frecuentes, *aadA* y *dfr/dfrA*. B) Estructura básica de un integrón de clase 2 con el gen para la integrasaint12 inactivo y los cassetes génicos *dfr1/dfrA1*, *sat* y *aadA*.

Puesto que los integrones suelen estar portados por plásmidos en muchos casos conjugativos, y estos a su vez suelen contener genes de resistencia a TMP, es previsible que estos genes *dfrA* se puedan transferir horizontalmente. Sin embargo se encontraron muy pocos trabajos que ensayaron experimentalmente la transferencia horizontal de genes *dfrA* (Lee et al., 2001; Poey et al., 2019).

Esta dispersión horizontal puede ocurrir por tres procesos diferentes: transformaciones, conjugaciones y transducciones. Se presume que el que ocurre más frecuentemente en la naturaleza es la conjugación bacteriana. Este es un mecanismo de transferencia horizontal de genes desde bacterias donantes hacia bacterias receptoras. Ocurre mediante contacto intercelular donde intervienen estructuras superficiales con funciones especializadas llamadas pili sexuales que hacen contacto con receptores específicos de la superficie de la bacteria receptora, formando el par conjugativo. La conjugación bacteriana depende exclusivamente de la presencia de un plásmido conjugativo, que necesariamente contiene un locus tra de unas 33kb donde están codificadas todas las funciones para la transferencia conjugativa. Generalmente en este proceso se transfiere el plásmido conjugativo, aunque éste a veces puede movilizar consigo segmentos del cromosoma bacteriano o plásmidos coexistentes llamados movilizables (Miller, 1993).

En este trabajo se realizó un relevamiento de los genes *dfrA* en cepas naturales de *E. coli* y se realizaron ensayos de transferencia horizontal de estos genes a *E. coli* K12.

II. Objetivos

II.1. Objetivo general:

Caracterizar fenotípica y genotípicamente la resistencia a trimetoprim (TMP) en aislamientos de *Escherichia coli* uropatógeno (UPEC) y estudiar su dispersión horizontal mediante conjugación bacteriana.

II.2. Objetivos específicos:

- 1) Releva en los bancos de datos la presencia de los distintos genes *dfrA* en cepas de *E. coli*.
- 2) Caracterizar la resistencia a TMP, sulfametoxazol (SMX) y co-trimoxazol (SXT) de un conjunto de aislamientos de UPEC.
- 3) Identificar los genes *dfrA*, de resistencia a TMP, presentes en los aislamientos.
- 4) Correlacionar los datos fenotípicos con los genotípicos.
- 5) Realizar conjugaciones de UPEC resistentes a TMP a la cepa de laboratorio *E. coli*K12 seleccionando los transconjugantes por su resistencia a TMP.

III. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en la sección de Fisiología y Genética Bacterianas de la Facultad de Ciencias, UdelaR. El mismo cuenta con dos colecciones de aislamientos de *E. coli* provenientes del Laboratorio de Bacteriología de un hospital público pediátrico y obstétrico de Montevideo entre los años 2008 y 2009. Todos los aislamientos de *E. coli* procedentes de urocultivos realizados en determinados períodos de tiempo dentro de esos años fueron incluidos, lo que otorga valor epidemiológico a dichas colecciones. Una de ellas comprende 120 muestras provenientes de 107 mujeres embarazadas que fueron hospitalizadas para el parto o por amenaza de parto prematura o aborto. Las muestras fueron incluidas siguiendo un criterio de inclusión previamente establecido en el cual se encuentran 94 procedentes de cultivos urinarios con recuento de colonias mayor a 10^5 ufc/mL y 26 muestras con recuento menor pero que presentaron una infección urinaria sintomática. La otra colección comprende 126 muestras de *E. coli* provenientes de 86 niños de 0 a 12 años con anomalías funcionales o anatómicas en su tracto urinario, que sufrían infecciones urinarias recurrentes. Dichas muestras fueron tomadas de cultivos con recuento de colonias siempre mayor a 10^5 ufc/mL. Para ambas colecciones se determinó la sensibilidad de cada aislamiento a los siguientes antibióticos: ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefuroxima (CXM), ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP) y

co-trimoxazol (SXT) por disco difusión. En esta colección también se analizó la susceptibilidad a cloranfenicol (CHL), tetraciclina (TET) y estreptomina (STR) por el método de antibiótico incorporado en placa. Además se determinó la filogenia, el contenido de virulencia y la presencia de integrones de clase 1 y 2 por PCR para todos los aislamientos (Poey et al., 2012, Poey et al., 2014).

III.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se seleccionaron 43 cepas de la colección de UPEC del laboratorio según la presencia o ausencia de integrones 1 y/o 2, y tomando en cuenta la presencia de múltiples resistencias a antibióticos, en particular a co-trimoxazol (SXT), que había sido analizada por disco difusión. Las cepas utilizadas fueron: 8 Int1⁺, 9 Int2⁺, 1 Int1⁺ Int2⁺ y 25 Int⁻. Se añadieron además dos cepas de *E. coli* de referencia: ATCC35218, de uso universal en microbiología clínica, portadora de un Int1 (nuestros resultados no publicados) y con características de virulencia típicas de UPEC (Azpiroz et al., 2009); y CFT073, uropatógena cuyo genoma está totalmente secuenciado (AC: AE014075) (Tabla 1).

Se utilizó medio de cultivo Luria Bertani (LB) en forma sólida. Se preparó con productos de la marca Becton-Dickinson. Este medio contiene por litro 10g de Bacto-Tripton, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl y 15g de agar; la preparación se esterilizó por autoclave a 121°C por 30 min. Se adicionaron antibióticos según correspondiera. La temperatura de incubación fue siempre de 37°C. Las concentraciones finales de los antibióticos utilizados fueron las siguientes: ampicilina (AMP), 100 µg/mL; ácido nalidíxico (NAL), 40 µg/mL; cloranfenicol (CHL), 60 µg/mL; tetraciclina (TET), 15 µg/mL; kanamicina (KAN), 30 µg/mL; estreptomina (STR), 100 µg/mL; sulfametoxazol (SMX), 1000 µg/mL; trimetoprim (TMP), 100, 150 y 250 µg/mL; y co-trimoxazol (SXT), 100 µg/mL TMP más 500 µg/mL SMX. Algunos de estos antibióticos se añadieron a las placas a partir de soluciones madre por rastrillado en superficie: NAL, TET, KAN y STR. Los compuestos AMP y CHL se añadieron al medio previo a su solidificación y plaqueo a partir de soluciones acuosas. En el caso de los antifolatos (TMP, SMX y SXT), que son sustancias altamente hidrofóbicas, se procedió de igual manera, pero a partir de soluciones en el solvente orgánico dimetilformamida, según ha sido descrito en Poey et al., 2019.

Tabla 1. Cepas de UPEC utilizadas, presencia de integrones de clase 1 y 2, y resistencias antibióticas de las mismas^a

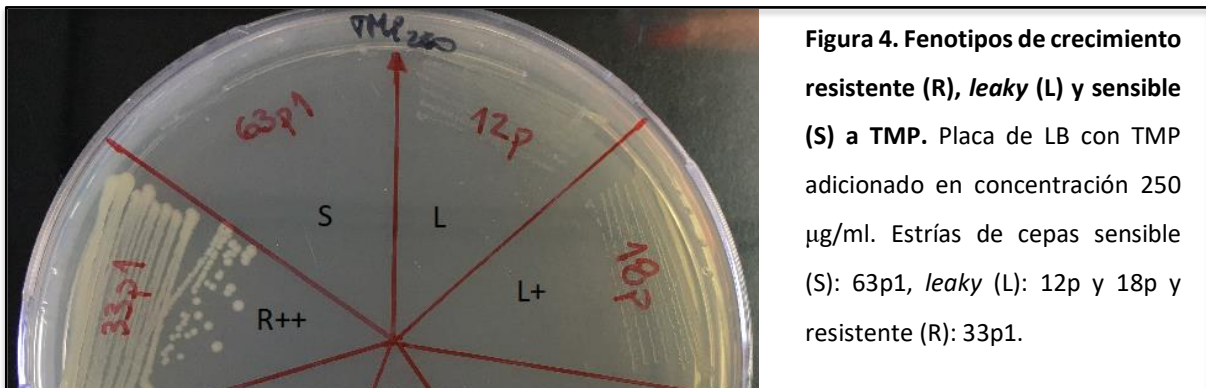
Cepa	Int	Resistencias	Cepa	Int	Resistencias
12p	-	AMP, NAL, TET, STR	46p1	-	AMP, TET, STR, SXT
21p	-	NAL, TET, STR	46	-	AMP, CEF, TET, STR, SXT
21e	-	AMP, CHL, TET, KAN	6e	1	AMP, STR, SXT
32p3	-	AMP, KAN	33p1	1	AMP, TET, STR, SXT
34p2	-	AMP, TET, STR	48p1	1	SXT
41p1	-	NAL, TET	70p1	1	AMP, SXT
45p2	-	NAL, CHL, TET	73p2	1	TET, SXT
47e	-	AMP, STR	77e	1	AMP, CHL, SXT
63p1	-	AMP, CHL, TET, STR	80p2	1	AMP, TET, STR, SXT
65p4	-	AMP, CHL, TET, KAN, STR	94e	1	AMP, TET, STR, SXT
64e	-	AMP, STR	27p	1,2	AMP, CHL, NAL, TET, STR, SXT
77p1	-	TET, STR	5e	2	AMP, NAL, CHL, SXT
83e	-	TET, STR	18p	2	NAL
93e	-	AMP, NAL	29e	2	STR
99e	-	AMP, STR	34e	2	AMP, NAL, TET, STR, SXT
137e	-	AMP, TET, KAN	64p1	2	AMP, CHL, STR, SXT
144e	-	AMP, NAL, KAN, STR	65p1	2	AMP, NAL, TET, STR, SXT
8p	-	AMP, CEF, CXM, NAL, CIP, CHL, TET, KAN, SXT	69e	2	STR
14p	-	AMP, NAL, CIP, CHL, TET, KAN, STR, SXT	71p1	2	AMP, TET, STR, SXT
16p	-	AMP, CEF, STR, SXT	74p2	2	AMP, NAL, TET, STR, SXT
35p1	-	AMP, CEF, NAL, KAN, STR, SXT	ATCC35218	1	AMP, CHL, STR
36p1	-	AMP, CEF, NAL, TET, KAN, STR, SXT	CFT073	-	-
37p1	-	AMP, TET, KAN, STR, SXT			

^a: Los nombres de las cepas incluyen una “e” si provienen de mujeres embarazadas y una “p” si vienen de niños.

III.2. Determinación de las resistencias antibióticas

Para analizar su susceptibilidad a los distintos antibióticos, las cepas se estiraron en placas de LB adicionadas de antibióticos. Se consideró que una cepa era resistente (R) cuando lograba crecer en una placa adicionada con el antibiótico formando una estría completa, con zona de crecimiento confluyente y con colonias aisladas. Se consideró sensible (S) cuando no logró crecer en presencia del antibiótico. En el caso de los compuestos antifólicos (TMP, SMX y STX), se añadió un tercer fenotipo, que denominamos *leaky* (L), el cual correspondió a un crecimiento intermedio entre

resistente y sensible, generalmente no formando colonias o, de hacerlo, estas sean pequeñas puntiformes (Figura 4). El nivel de crecimiento considerado fue a las 24 hrs de incubación.



III.3. Análisis in silico/bioinformático

Se realizaron varios análisis in silico usando la base de datos GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, de libre acceso, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y a través de la herramienta BLAST.

Se buscaron los distintos tipos de genes *dfrA* registrados en el GenBank, restringiendo la búsqueda al organismo *E. coli*. Luego, de entre estos, se seleccionaron y se catalogaron como frecuentes aquellos genes cuya secuencia hubiese aparecido completa (100% identidad de longitud y 100% identidad de secuencia) en más de 15 cepas a la fecha 02/06/20. Posteriormente se analizó la similitud de las secuencias de los *dfrA* frecuentes en *E. coli* por el programa Multalin (Corpet, 1988).

Además, se buscó la presencia de integrones de clase 1 y 2 en todas las cepas portadoras de los distintos *dfrA* frecuentes en *E. coli* a la fecha 02/06/20. Concretamente, se buscó en las cepas cuyo genoma estaba totalmente secuenciado la presencia de los genes para las integrasas 1 y 2 completos.

III.4. Análisis genético por PCR

Se buscó la presencia de nueve genes *dfrA* (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA8*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA15*, *dfrA17* y *dfrA27*) mediante PCR independientes para cada gen en las cepas de la subcolección. El lisado celular utilizado como molde de cada muestra fue obtenido por el método de lisis por calor: tomando una ansada de estrías frescas (18-24 horas de incubación a 37°C), suspendiendo en 500µL de agua y llevando cada suspensión a 80°C por 30 min.

Las amplificaciones fueron realizadas siempre con un volumen final de 30 μ L. Se utilizaron tres ADN polimerasas distintas dependiendo de su disponibilidad comercial (Tabla 2). El termociclador utilizado fue de la marca Biometra, modelo Tpersonal.

Tabla 2. Condiciones de reacción y de amplificación para las Taq polimerasas utilizadas

Polimerasa	Componentes para una reacción ^a					Condiciones de amplificación
	Unidades de taq	Buffer 10X (mL)	dNTP ^b c/u (μ M)	Cebador c/u (μ M)	Molde (μ L)	
U-taq DNA polymerase (SBS Genetech)	1.87	3	250	0.15	5	Desnaturalización: 94°C por 2 min; 30 ciclos de (i) desnaturalización: 94°C por 2 min (ii) hibridación: 2°C menos que la T _m del cebador con menor T _m por 30 seg (iii) elongación: 72°C por 30 seg; extensión final: 72°C por 2 min
Taq DNA Polymerase (Biolabs)	0.75	3	200	0.2	5	Desnaturalización: 95°C por 30 seg; 30 ciclos de (i) desnaturalización: 95°C por 30 seg (ii) hibridación: 5°C menos que la T _m del cebador con menor T _m por 30 seg (iii) elongación: 68°C por 30 seg; extensión final: 68°C por 5 min
High-taq DNA Polymerase (Bioron)	2.5	3	200	0.2	5	Desnaturalización: 94°C por 2 min; 30 ciclos de (i) desnaturalización: 94°C por 10 seg (ii) hibridación: 2°C menos que la T _m del cebador con menor T _m 20 seg (iii) elongación: 72°C por 1 min; extensión final: 72°C por 2 min

^a: Se completó con agua destilada estéril hasta completar los 30 μ L

^b: Desoxinucléotido trifosfato

Siempre se incluyó un control blanco, el cual careció de molde (lisado celular) agregando 5 μ L de agua en su lugar. Esto fue realizado para verificar la ausencia de contaminación en los demás reactivos. Los cebadores utilizados se diseñaron específicamente para cada gen a partir de secuencias obtenidas en la base de datos y se mandaron sintetizar a la empresa Macrogen, Korea (Tabla 3). Para los genes dfrA1, dfrA5, dfrA7, dfrA15 y dfrA17 se contó con controles positivos, que fueron cepas portadoras de dichos genes descritas por Poey & Laviña en 2018, estudio en el cual se secuenció la región variable de integrones de clase 1.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se agregó a cada muestra 7.5 μ L de Buffer Stop o de carga, el cual detiene toda actividad enzimática evitando de esta manera la posible degradación de las amplificaciones. Posteriormente los amplicones se revelaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, concentración que permite discriminar tamaños de bandas como los esperados (Tabla 3). Los geles se tiñeron en bromuro de etidio. Para cada muestra se sembró 13 μ L de reacción. Se añadió

en cada gel un marcador de peso molecular o ladder de 100pb (100 bp DNA Ladder, Biolabs). Los voltajes para la corrida electroforética fueron de 70V por 15 min y luego 55V por el tiempo que se consideró necesario para cada amplificación.

Tabla 3. Cebadores específicos para cada gen utilizados en las reacciones de PCR

Gen	“Forward” 5’-3’	“Reverse” 5’-3’	Temperatura de melting (T _m) (°C) ^a	Tamaño del amplicón (pb)
<i>dfrA1</i>	CACGTTCAAGTTTTACATCTGAC	CCCTTTTGCCAGATTTGGTAACTAT	59.3 – 62.5	283
<i>dfrA5</i>	TGGACGGCCGATAATGACAAC	CATCTCCTTCCGGCTCAATATC	61.3 – 62.1	180
<i>dfrA7</i>	GGTCAGCAAAAAGGTGAGCAGT	CAACGTGAACAGTAGACAAATG	61.3 – 58.4	294
<i>dfrA8</i>	ATGATCGAGCTTCATGCCATT	CCTTCACACTTACTTCACTTACC	57.4 – 61.1	480
<i>dfrA12</i>	TGAACTCGGAATCAGTACGCATT	ATAAACGGAGTGGGTGTACGGAA	61.1 – 62.9	480
<i>dfrA14</i>	CATTGATGGCTGCGAAAGCGAA	AAAACATCCCCCTCTGGCTC	62.1 – 60.5	370
<i>dfrA15</i>	AACTCGTTCAAGCTTCACTTCCAG	CCCTTTTGCCAGATTTGGTAACTAT	63.5 – 62.5	285
<i>dfrA17</i>	GGTCAGTAAAAGGTGAGCAAC	CAACGTGAACAGTAGACAAATG	59.4 – 58.4	294
<i>dfrA27</i>	AGCAAGAAATGGGGTTATTGG	TTCCTGCTCGAACACCACATT	57.4 – 59.4	400
<i>folA</i>	GAACCGGAAACGAAACCCTCAT	GATATAGGAAGGCCGGATAAGAC	62.1 – 62.9	766

^a: Para la hibridación de usaron números enteros

III.5. Experimentos de conjugación

Los experimentos de conjugación fueron realizados en placas de LB adicionadas de TMP (200µg/ml) y KAN o LB con TMP (200µg/ml) y NAL. Se utilizó como cepa receptora a *E. coli* K12 BZB 1011 (*gyrAΔhsdR::kan*), que es sensible a TMP y resistente a ambos compuestos, NAL y KAN. Se seleccionaron como cepas donantes las UPEC que fueron resistentes a TMP y también algunas de fenotipo *leaky*. Las seleccionadas también debieron ser sensibles a KAN y/o NAL. El procedimiento empleado se denomina “cross-streaking”: consiste en sembrar en dichas placas listones de una suspensión de la cepa receptora y estriar perpendicularmente las cepas donantes. Luego de incubación, los transconjugantes crecerán en las zonas de cruce entre donantes y receptora. En las zonas de siembra de las cepas receptora y donante por fuera del cruce no deberá haber crecimiento ya que estarán inhibidas por el antibiótico de la selección (TMP) o de la contraselección (NAL/KAN),

respectivamente. De esta manera estas zonas de no crecimiento oficiaron como controles de la operación genética.

En un paso posterior se pretendía analizar los transconjugantes obtenidos para detectar la transferencia de genes *dfrA*. Luego, puesto que todos los transconjugantes compartirían el mismo contexto genético general, se podría comparar fenotípicamente la resistencia a TMP de los mismos para establecer si los distintos genes *dfrA* conferían o no distintos niveles de resistencia al compuesto. Estos análisis experimentales no pudieron ser llevados a cabo debido al surgimiento de la pandemia del COVID-19 y el trabajo concluyó con la obtención de transconjugantes resistentes a TMP.

IV. Resultados

IV.1. Resistencias antibióticas de las cepas de UPEC

IV.1.1. Corroboración de resistencias

En primer lugar se corroboraron por el método de antibiótico incorporado en placa las resistencias antibióticas que habían sido descritas anteriormente para cada cepa por disco difusión (Poey et al., 2012) (Tabla 1). Esto se realizó porque los genes de resistencia suelen ser portados por plásmidos y estos se pueden perder naturalmente con alguna frecuencia. La mayor parte de las cepas mantuvo sus resistencias descritas pero hubo casos puntuales en los que se observó heterogeneidad fenotípica frente a un antibiótico; en dichos casos se seleccionó y purificó las colonias que cumplían las resistencias originales. De esta manera se conformó una subcolección de 43 cepas de UPEC más dos cepas de referencia, ATCC35218 Y CFT073.

IV.1.2. Resistencias a inhibidores de la vía del ácido fólico

De las 43 cepas de UPEC que fueron seleccionadas, 23 habían sido resistentes a SXT por el método de disco difusión (Tabla 1). Ahora, por el método de SXT incorporado en placa, en concentraciones 100µg/ml de TMP más 500 µg/ml de SMX, que es la proporción de estos antibióticos usada en terapéutica, solo 21 fueron resistentes. De las dos restantes, una de ellas (5e) dio un fenotipo *leaky* y la otra (46e) dio sensible (Tabla 4). Como se explicó anteriormente, en microbiología clínica se determina la resistencia a SXT, pero no a sus componentes por separado. Este trabajo se diferencia en que se analizaron todas las cepas para su resistencia a TMP y a SMX por separado, ambos incorporados en placas de LB (Tabla 4).

Las 21 UPEC que fueron resistentes a SXT también lo fueron a TMP y SMX por separado. Además hubo nueve UPEC, entre las que se encontró la cepa anteriormente mencionada 46e, que fueron resistentes solo a SMX y tres UPEC que fueron resistentes solo a TMP, siendo una de ellas la 5e. Las 10 restantes fueron sensibles a los tres antifolatos. En cuanto a las cepas de referencia, ATCC35218 fue resistente únicamente a SMX mientras que CFT073 fue sensible a los tres compuestos. Cabe señalar que el fenotipo *leaky* fue considerado como sensible. Estos resultados mostraron que para ser resistente a SXT se necesitaron ambas resistencias, a SMX y TMP.

Tabla 4. Fenotipo de resistencia a trimetoprim^a (TMP), sulfametoxazol (SMX) y co-trimoxazol (SXT) de las cepas de la colección^b

Cepa	Int	TMP	SMX	SXT	Cepa	Int	TMP	SMX	SXT
12p	-	L	R	S	46p1	-	R	R	R
21p	-	L	S	S	46e	-	L	R	S
21e	-	L	R	S	6e	1	R	R	R
32p3	-	L	S	S	33p1	1	R	R	R
34p2	-	L	R	S	48p1	1	R	R	R
41p1	-	L	R	S	70p1	1	R	R	R
45p2	-	L	S	S	73p2	1	R	R	R
47e	-	L	R	S	77e	1	R	R	R
63p1	-	S	R	S	80p2	1	R	R	R
65p4	-	S	S	S	94e	1	R	R	R
64	-	L	R	S	27p	1,2	R	R	R
77p1	-	L	S	S	5e	2	R	L	L
83e	-	L	S	S	18p	2	L	L	S
93e	-	L	L	S	29e	2	R	L	S
99e	-	L	R	S	34e	2	R	R	R
137	-	L	S	S	64p1	2	R	R	R
144	-	L	S	S	65p1	2	R	R	R
8p	-	R	R	R	69e	2	R	S	S
14p	-	R	R	R	71p1	2	R	R	R
16p	-	R	R	R	74p2	2	R	R	R
35p1	-	R	R	R	ATCC35218	1	L	R	S
36p1	-	R	R	R	CFT073	-	L	L	S
37p1	-	R	R	R					

^a: 100 µg/ml

^b: En naranja, cepas portadoras del Int1; en celeste, cepas portadoras del Int2; en púrpura, cepas portadoras de Int1 + Int2.

Esta subcolección había sido analizada previamente para la presencia de integrones de clase 1 y 2 (Poey et al., 2014). Nuestros resultados mostraron una alta asociación entre estos elementos genéticos y la resistencia a los antifolatos (Tabla 4). También se desprende de la tabla que todas las cepas de UPEC con integrón 1 portaron las tres resistencias a los tres compuestos, TMP, SMX y SXT. En cuanto al integrón 2, la relación con estas resistencias fue más laxa. Por último, siete cepas que no portaban ningún integrón y que eran multiresistentes (Tabla 1), resultaron resistentes a los tres compuestos.

En un siguiente paso se estudió la susceptibilidad de todas las cepas a distintas concentraciones de TMP (150 µg/ml y 250 µg/ml) para analizar si los fenotipos obtenidos variaban con las mismas, en

particular el fenotipo *leaky*. El resultado fue que no hubo variación de los fenotipos según la concentración de TMP empleada (datos no mostrados). A diferencia de lo que sucedía con una misma cepa en distintas concentraciones del antibiótico, a una misma concentración se encontraron diferencias entre los fenotipos de las distintas cepas (Figura 5). Tomando como hipótesis que dicha diferencia se podía deber a la presencia de diferentes genes de resistencia *dfrA* así como al contexto genético general de cada cepa, se establecieron niveles de resistencia fenotípica según la densidad de crecimiento de la estría y según el tamaño de las colonias (Tabla 5). De esta forma, “R” fue el nivel de resistencia basal y “R+++” el más alto; de igual manera se realizó para el fenotipo *leaky* (L). Los niveles de resistencia fenotípica fueron los mismos para cada cepa en todas las concentraciones de TMP empleadas.

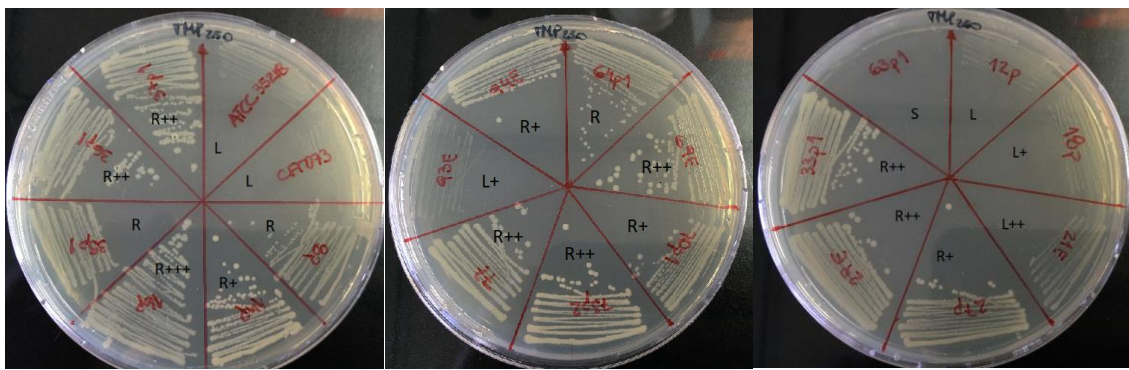


Figura 5. Estrías de las cepas de la subcolección en placas de LB con TMP 250 µg/ml. S: fenotipo sensible. L: fenotipo *leaky*. R: fenotipo de resistencia. Los (+) corresponden a niveles de crecimiento más fuerte.

Tabla 5. Niveles de resistencia fenotípica a TMP 250 µg/ml de las cepas analizadas

Cepa	TMP ^R	Cepa	TMP ^R	Cepa	TMP ^R
12p	L	137	L++	77e	R++
21p	L	144	L++	80p2	R+
21e	L++	8p	R	94e	R+
32p3	L++	14p	R+	27p	R+
34p2	L+++	16p	R+++	5e	R+
41p1	L	35p1	R	18p	L+
45p2	L++	36p1	R++	29e	R++
47e	L+++	37p1	R++	34e	R
63p1	S	46p1	R+	64p1	R+
65p4	S	46e	L++	65p1	R++
64	L++	6e	R	69e	R++
77p1	L+++	33p1	R++	71p1	R+
83e	L+++	48p1	R+	74p2	R+
93e	L+	70p1	R	ATCC35218	L
99e	L+	73p2	R++	CFT073	L

Si bien para esta etapa se catalogaron las cepas con fenotipo *leaky* como sensibles a modo de agruparlas, no se podía descartar que las cepas con los fenotipos *leaky* más fuertes debieran su crecimiento a la presencia de algún gen *dfrA* que confiriese poca resistencia al TMP. Por esto se decidió incluir algunas de ellas en los análisis genotípicos posteriores.

IV.2. Análisis bioinformático de los genes *dfrA* en *E. coli*

Se buscaron en el GenBank los distintos genes *dfrA* (también llamados *dfr*) descritos, que en principio eran del 1 al 35, criterio establecido originalmente con las primeras descripciones (Sköld, 2001). Como primer resultado se constató que los genes *dfrA4* y *dfrA33* no estaban descritos y que el gen *dfrA2* correspondía a un pseudogen en todas sus anotaciones. Los 32 genes restantes se encontraron en diversos géneros de bacterias Gram negativas y de estos, 22 se encontraron en la especie *E. coli*, aunque en general no exclusivamente. En la Tabla 6 se presentan estos genes con el número de acceso de la secuencia que contiene cada gen *dfrA* elegido como referencia, el tamaño de cada gen y el de su producto. También se presenta el número de secuencias idénticas (100% de cobertura y 100% de identidad) encontradas en *E. coli* en la base de datos, según un análisis realizado con el programa Blast. Se observaron para un mismo *dfrA* algunas variaciones en su secuencia en cuanto al inicio del gen, lo que hace suponer que son diferencias de anotación genómica. Cabe resaltar también que existe una alta similitud de secuencia entre los distintos *dfrA*, e incluso entre estos y el gen cromosomal *folA* (figura 6).

A partir de estos relevamientos se seleccionaron los nueve genes *dfrA* más frecuentes en *E. coli* (en verde en Tabla 6), con los cuales se procedió luego a realizar el análisis genotípico. Todos estuvieron presentes en más de 15 cepas. Como se presenta en el próximo apartado de análisis genético, dos de ellos no se encontraron en nuestra colección: *dfrA12* y *dfrA27*, por lo que no continuamos su análisis *in silico*. Para los restantes siete genes *dfrA* se presentan el número total de cepas de *E. coli* en las que se los halló, consignando las que estaban totalmente secuenciadas y, dentro de estas últimas, la presencia de integrones de clase 1 y/o 2 (Tabla 7). En general, se observó una muy alta asociación de los genes *dfrA* con los integrones (97%), siendo muy escasas las cepas *dfrA*⁺ sin integrón.

Tabla 6. Genes *dfrA* de referencia tomados del GenBank

Gen ^a	Nº de acceso en GenBank ^b	Tamaño del gen de referencia (pb)	Tamaño del producto del gen de referencia (aa)	Nº de secuencias idénticas en <i>E. coli</i> ^c
<i>dfrA1</i>	MH208299.1	474	157	165
<i>dfrA5</i>	MH208293.1	477	158	70
<i>dfrA7</i>	MH208294.1	474	157	144
<i>dfrA8</i>	NG_047741.1	510	169	17
<i>dfrA9</i>	X57730.1	534	177	2
<i>dfrA10</i>	NG_047686.1	564	187	2
<i>dfrA12</i>	MH208295.1	498	165	274
<i>dfrA13</i>	NG_047693.1	498	165	2
<i>dfrA14</i>	MH208298.1	483	160	111
<i>dfrA15</i>	MH252939.1	459	152	23
<i>dfrA16</i>	NG_047707.1	474	157	2
<i>dfrA17</i>	MH208302.1	474	157	461
<i>dfrA19</i>	NG_050403.1	570	189	7
<i>dfrA21</i>	MH556868.1	498	165	2
<i>dfrA22</i>	NG_047716.1	498	165	2
<i>dfrA23</i>	AJ746361.2	561	185	5
<i>dfrA24</i>	AJ972619.1	558	185	2
<i>dfrA25</i>	FN252408.1	459	152	2
<i>dfrA26</i>	AM403715.1	552	183	2
<i>dfrA27</i>	MN304935.1	474	157	41
<i>dfrA29</i>	KX118301.1	459	152	3
<i>dfrA35</i>	NG_064658.1	513	170	1

^a: Los genes resaltados en verde fueron los analizados experimentalmente en este estudio.

^b: Número de acceso de la secuencia que contiene el gen tomado como referencia, no necesariamente en *E. coli*.

^c: A la fecha 02/06/20.

Tabla 7. Frecuencia de aparición de genes *dfrA* frecuentes en *E. coli* en el GenBank y su asociación con integrones de clase 1 y 2^a

Gen <i>dfrA</i>	Nº de cepas de <i>E. coli</i> positivas para el gen	Cepas positivas con genoma totalmente secuenciado ^b				
		Número	Int1 ⁺	Int2 ⁺	Int1 ⁺ + Int2 ⁺	Sin Int
<i>dfrA1</i>	161	22	11	0	11	0
<i>dfrA5</i>	62	16	9	0	6	1
<i>dfrA7</i>	141	8	0	0	8	0
<i>dfrA8</i>	17	12	3	4	3	2
<i>dfrA14</i>	101	58	13	2	42	1
<i>dfrA15</i>	22	0	0	0	0	0
<i>dfrA17</i>	412 ^c	65	28	0	36	1
Totales		181	64	6	106	5
%		100	35	3	59	3

^a: realizado el 02/06/2020

^b: cepas con cromosoma y plásmidos totalmente secuenciados según Genbank.

^c: Debido a su alto número se analizaron las primeras 100 cepas positivas para el gen en el blast.

IV.3. Análisis genético por PCR

IV.3.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron parejas de cebadores específicos para cada gen *dfrA* frecuente en *E. coli* (Figura 6). Para ello se utilizó el programa OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies) de libre acceso en <https://www.idtdna.com/pages>. Los criterios empleados para el diseño de los cebadores fueron: (i) tamaño de entre 20 y 25 nucleótidos, (ii) una T_m (melting temperature) de entre 50 y 60°C, (iii) que no formaran horquillas con un ΔG negativo y (iv) que no formaran homodímeros ni heterodímeros que comprometieran el extremo 3' de las secuencias, procurando el mayor ΔG posible. Debido a la alta similitud de secuencia de algunos genes en particular, los cebadores tuvieron que diseñarse con sus extremos 3' en las acotadas diferencias. Por ejemplo, los genes *dfrA1* y *dfrA15*, *ydfrA7* y *dfrA17*, tuvieron 8 y 7 nucleótidos de diferencia, respectivamente. Más aún la similitud fue tal que en ambos casos compartieron el cebador reverso.

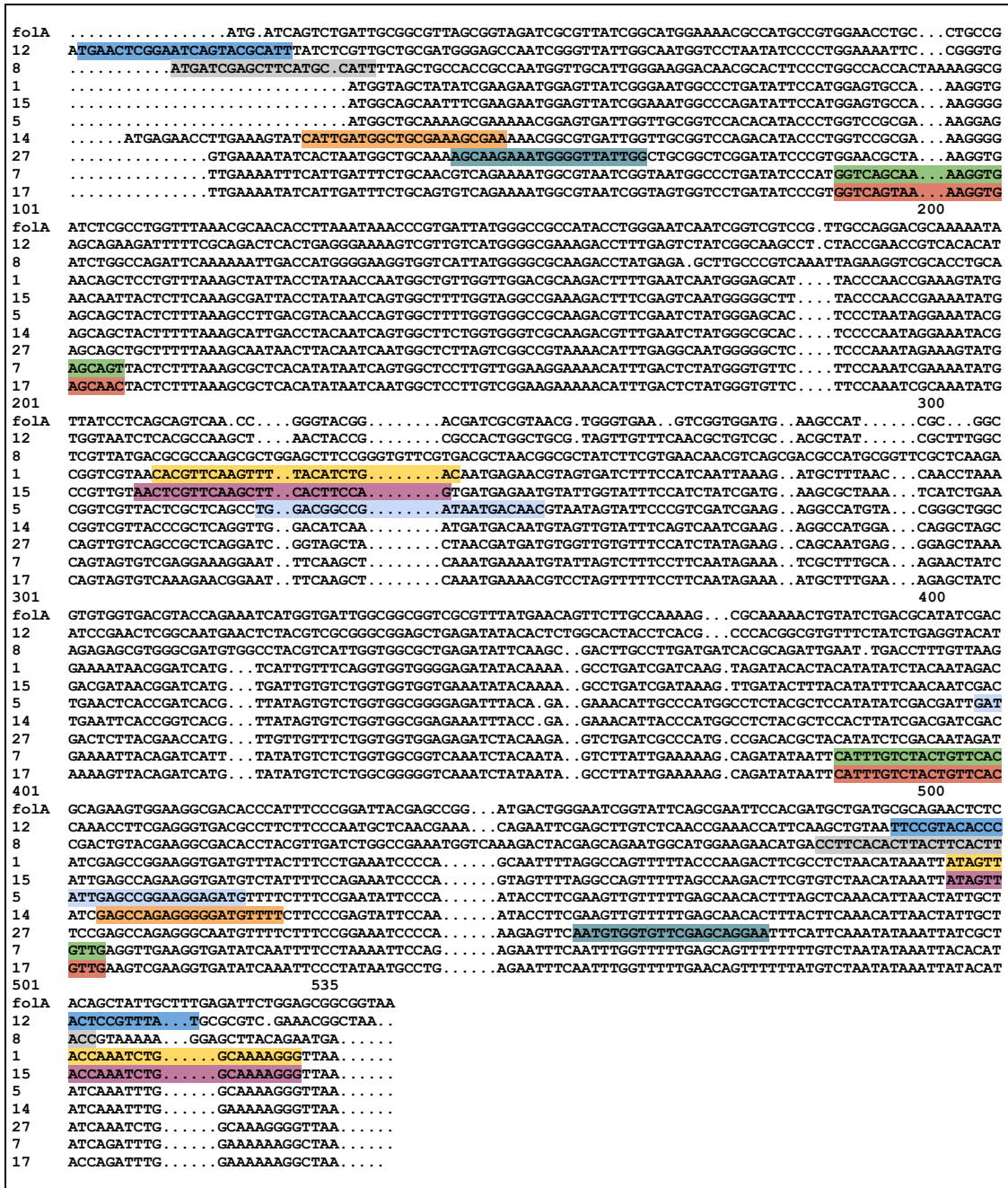


Figura 6. Alineamiento de los genes *dnaA* frecuentes en *E. coli* por el programa Multalin (Corpet, 1988). Para cada gen *dnaA* se utilizó el mismo color para resaltar los cebadores F (forward) y la secuencia complementaria al cebador R (reverso). Se incluyó en el alineamiento la secuencia del gen *folA* del cromosoma de *E. coli* K12.

Se observó que además de las diferencias de secuencia, se encontraron diferencias en los comienzos de los distintos genes y por ende en las longitudes de los mismos. El gen *dnaA12* fue el más parecido en secuencia al gen cromosómico *folA*, seguido por el *dnaA8*, que resultó ser el más largo. Los restantes presentaron un alto grado de conservación entre sí.

IV.3.2. Detección de genes *dfrA* en las cepas de la subcolección

Se buscó por PCR la presencia de los nueve genes *dfrA* antes mencionados en las cepas de la subcolección, incluidas las dos de referencia, ATCC35218 y CFT073. En un principio se buscaron en todas las cepas independientemente de su fenotipo a TMP. Posteriormente, al notar que no se detectaban genes *dfrA* en las cepas sensibles o *leaky*, se acotó la búsqueda a las cepas fenotípicamente resistentes a TMP, a las *leaky* fuertes, a cepas *leaky* pero con integrón (18p) y a dos cepas fenotípicamente sensibles a TMP (63p1 y 65p4) como control. Se encontraron genes *dfrA* en 22 (92%) de las 24 cepas resistentes a TMP y ninguno en las cepas sensibles o *leaky* (Tabla 8).

El gen *dfrA1* apareció en 11 cepas, siendo el más frecuente y estando siempre asociado a integrones, particularmente al de clase 2 (82%). El siguiente gen más frecuente fue el *dfrA17*, con 5 apariciones, en cepas tanto sin integrón como con integrón de clase 1. El gen *dfrA14* apareció siempre acompañado de otro *dfrA*, el 5 o el 1. El *dfrA8* apareció siempre en cepas sin integrón y los genes *dfrA12* y 27 no se encontraron en ninguna cepa (Figura 7).

No se observó ninguna clara correlación entre el tipo de gen *dfrA* y el nivel de resistencia a TMP de las cepas. Otro resultado de interés es que dos cepas resistentes a trimetoprim fueron negativas para los genes *dfrA* analizados: 46P1 y 70P1.

Se constató que las reacciones fueron realmente específicas y no se dieron falsos positivos por reacciones cruzadas. Las bandas obtenidas en los geles para cada *dfrA* fueron siempre del tamaño esperado, algunos ejemplos se muestran en la Figura 8. Esto fue muy importante teniendo en cuenta la alta similitud de secuencia que presentaron los genes *dfrA*. Cabe resaltar que en los casos de los genes *dfrA1* y *dfrA15* y *dfrA7* y *dfrA17*, los cuales compartieron el mismo cebador reverso debido a su elevada similitud, no se notaron reacciones cruzadas. A modo de ejemplo, la cepa 48p1, portadora del gen *dfrA15*, fue negativa para el gen *dfrA1*, como se observa en la Figura 8 A.

Tabla 8. Genes *dfrA* y nivel de susceptibilidad a TMP en las cepas de UPEC analizadas por PCR^{a, b, c}

Cepa	Int	TMP ^R	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA5</i>	<i>dfrA7</i>	<i>dfrA8</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA15</i>	<i>dfrA17</i>	<i>dfrA27</i>
34p2	-	L+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47e	-	L+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63p1	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65p4	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77p1	-	L+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83e	-	L+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8p	-	R	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14p	-	R+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
16p	-	R+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
35p1	-	R	-	+	-	-	-	+	-	-	-
36p1	-	R++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
37p1	-	R++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
46p1	-	R+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6e	1	R	-	+	-	-	-	+	-	-	-
33p1	1	R++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
48p1	1	R+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
70p1	1	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73p2	1	R++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
77e	1	R++	-	-	-	-	-	-	-	+	-
80p2	1	R+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
94e	1	R+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
27p	1,2	R+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
5e	2	R+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18p	2	L+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29e	2	R++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34e	2	R	+	-	-	-	-	-	-	-	-
64p1	2	R+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
65p1	2	R++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
69e	2	R++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
71p1	2	R+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
74p2	2	R+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC35218	1	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFT073	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aReacciones positivas (+), reacciones negativas (-)

^bEn verde oscuro, genes *dfrA* previamente detectados que se utilizaron como controles positivos; en verde claro, genes *dfrA* detectados en este trabajo.

^cEn naranja, cepas portadoras del Int1; en celeste, cepas portadoras del Int2; en púrpura, cepas portadoras de Int1 Int2.

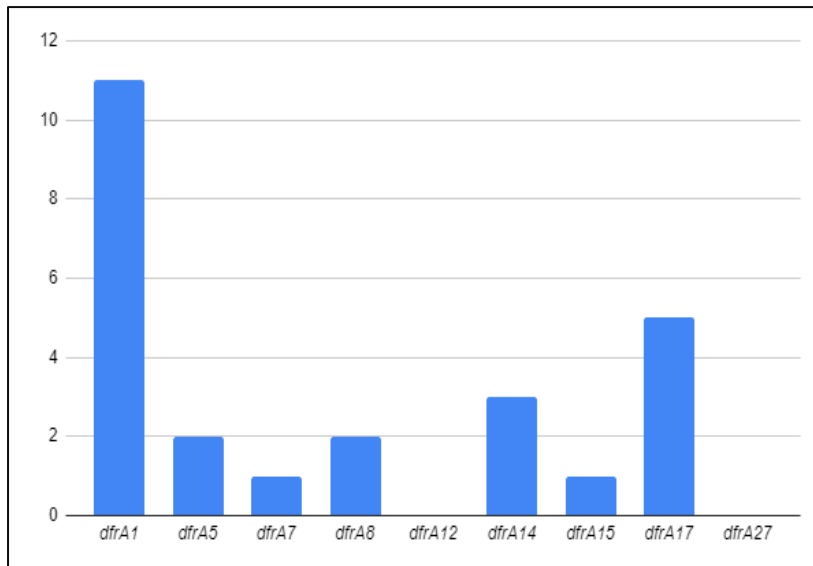


Figura 7. Frecuencia de aparición de los genes *dfrA* analizados en la subcolección de UPEC. Cantidad de cepas en los que se detectaron los distintos genes *dfrA* analizados en este trabajo.

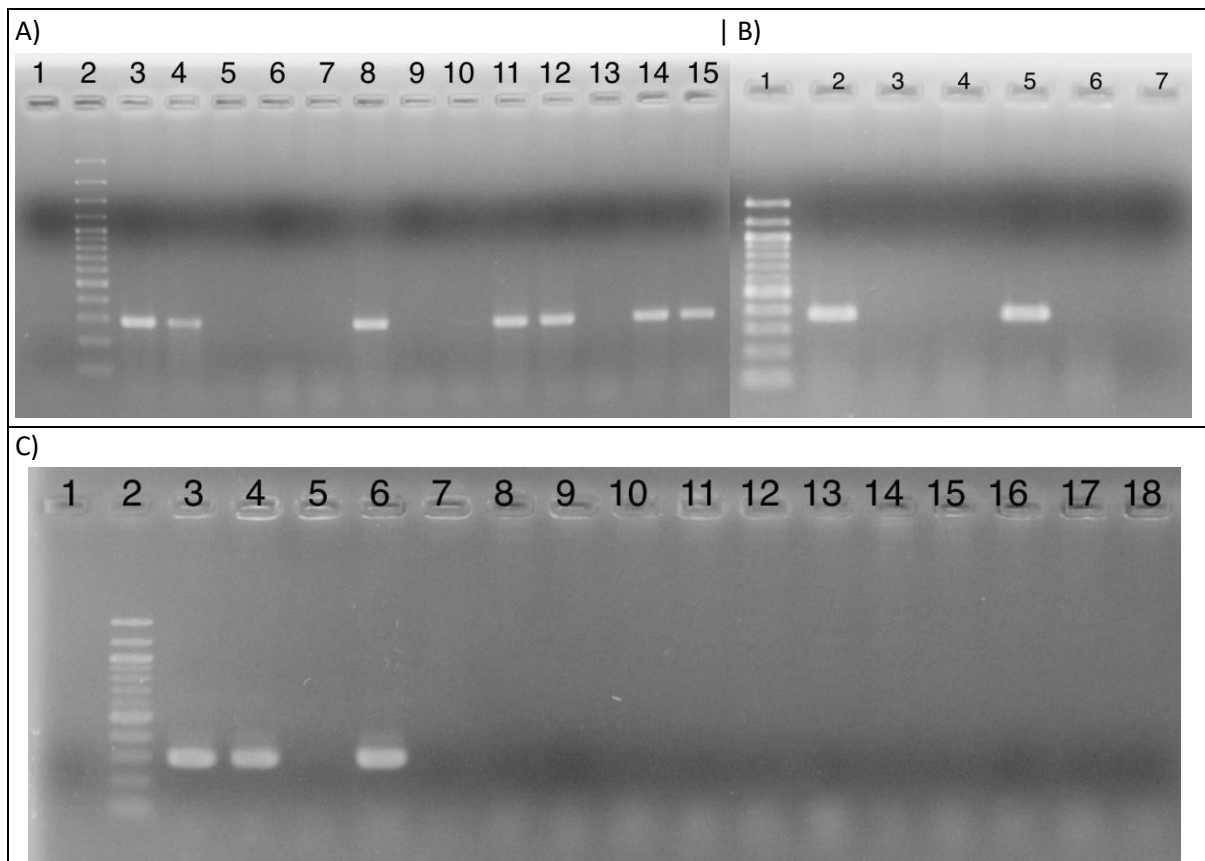


Figura 8. Amplificaciones de genes *dfrA* por PCR. Geles de agarosa al 2%. **A) *dfrA1* (283pb):** (1) blanco, (2) Ladder 100pb (Biolabs), (3) 73p2 (control positivo), (4) 33p1 (control positivo), (5) CFT073 (control negativo), (6) 6e, (7) 16p, (8) 27p, (9) 37p1, (10) 48p1, (11) 64p1, (12) 65p1, (13) 70p1, (14) 71p1, (15) 74p2. **B) *dfrA14* (370pb):** (1) Ladder 100pb, (2) 35p1, (3) 8p, (4) 14p, (5) 6e, (6) 71p1, (7) blanco. **C) *dfrA17* (294pb):** (1) Blanco, (2) Ladder 100pb, (3) 77e(control positivo), (4) 94e (control positivo), (5) 77p1, (6) 14p, (7) 70p1, (8) 27p, (9) 5e, (10) 18p, (11) 29e, (12) 34e,(13) 64p1, (14) 65p1, (15) 69e, (16) 71p1, (17) 74p2, (18) ATCC35218.

IV.4. Conjugaciones de cepas de UPEC con *E. coli* K12

Se realizaron conjugaciones entre 24 cepas de UPEC de la subcolección y *E. coli* K12 BZB1011 (*gyrAΔhsdR::kan*). Esta última cepa tiene fenotipo resistente a NAL por la mutación *gyrA* que contiene y es también resistente a KAN por tener insertado en el gen *hsdR* un casete *kan*. Además, por tener deletado el gen *hsdR* no degrada el ADN foráneo, por lo que será una buena receptora de elementos genéticos móviles en las conjugaciones. Como donantes se seleccionaron las cepas de UPEC resistentes o *leaky* fuerte a TMP y que fueran sensibles a NAL y/o KAN. La susceptibilidad de estas cepas a KAN o NAL se muestra en la Tabla 1. En estas conjugaciones se buscó obtener transconjugantes resistentes a TMP que hubieran recibido plásmidos con genes *dfrA* procedentes de las cepas UPEC donantes. Estos fueron seleccionados en placas de LB adicionadas con TMP (200 µg/ml) como selección y con NAL o KAN como contraselección.

Los resultados se presentan en la Tabla 9 y se muestran algunos ejemplos en la Figura 9. Conjugaron 8 de las 24 cepas donantes, todas fenotípicamente resistentes a TMP. Cuatro de ellas portaron un integrón de clase 1, una un integrón de clase 2 y una ambas clases de integrones. De las dos cepas resistentes a TMP que fueron negativas para los *dfrA* analizados, una transfirió la resistencia a TMP (46p1) y la otra no (70p1). Ninguna de las cepas con fenotipo *leaky* fuerte dio lugar a aparición de clones resistentes a TMP. Todos los transconjugantes obtenidos fueron aislados y reaislados en placas de LB con TMP y KAN o NAL según correspondiera. El estudio de estos transconjugantes así como su análisis genético para confirmar la presencia de los genes *dfrA* no pudo ser llevado a cabo debido al surgimiento de la pandemia COVID-19.

En la Figura 9 se puede notar que los listones de la cepa receptora tuvieron un crecimiento *leaky* frente al TMP, el cual es bastante característico de las *E. coli* sensibles debido a la acción bacteriostática de este antibiótico. En algunos casos, en la placa con contraselección KAN, se observó algo de crecimiento en algunas de las estrías donantes, lo que se podría explicar por los distintos niveles de susceptibilidad de las cepas naturales a los antibióticos. De hecho aquí se utilizaron las concentraciones efectivas para inhibir el crecimiento de *E. coli* K12. Por ejemplo, se destaca el crecimiento de la cepa 47e en ambas estrías sembradas, aunque es inferior al crecimiento de una *E. coli* resistente a KAN, como por ejemplo los transconjugantes de 46p1 o de 48p1.

Tabla 9: Conjugaciones de cepas de UPEC por *E. coli* K12

Cepa	Int	Gen <i>dfrA</i>	TMP ^R	Transconjugantes
34p2	-	-	L+++	No
47e	-	-	L+++	No
77p1	-	-	L+++	No
83e	-	-	L+++	No
16p	-	<i>dfrA8</i>	R+++	Si
37p1	-	<i>dfrA8</i>	R++	No
46p1	-	-	R+	Si
6e	1	<i>dfrA5, dfrA14</i>	R++	No
33p1	1	<i>dfrA1</i>	R++	Si
48p1	1	<i>dfrA15</i>	R+	Si
70p1	1	-	R	No
73p2	1	<i>dfrA1</i>	R++	Si
77e	1	<i>dfrA17</i>	R+6	No
80p2	1	<i>dfrA5</i>	R+	No
94e	1	<i>dfrA17</i>	R6	Si
27p	1,2	<i>dfrA1, dfrA14</i>	R+	Si
5e	2	<i>dfrA1</i>	R+	No
29e	2	<i>dfrA1</i>	R++	No
34e	2	<i>dfrA1</i>	R	No
64p1	2	<i>dfrA1</i>	R+	No
65p1	2	<i>dfrA1</i>	R++	No
69e	2	<i>dfrA1</i>	R++	No
74p2	2	<i>dfrA1</i>	R+	No
71p1	2	<i>dfrA1</i>	R+	Si

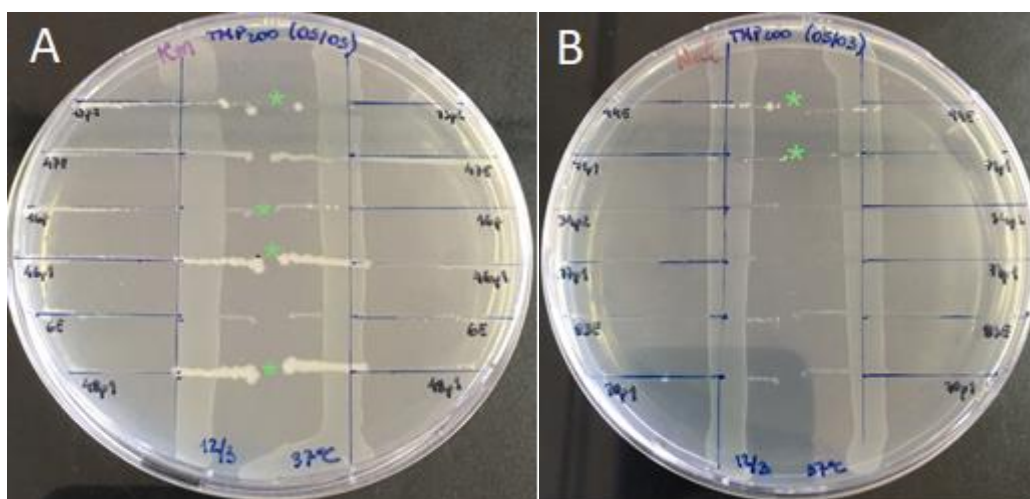


Figura 9: Placas de conjugación por cross-streaking de cepas de UPEC por *E. coli* K12. Los transconjugantes están señalados con asterisco verde. A) Placa de LB con TMP incorporado como selección y KAN como contraselección. B) Placa de LB con TMP incorporado como selección y NAL como contraselección.

V. Discusión

En este trabajo se seleccionaron 43 cepas de UPEC pertenecientes a 230 cepas de una colección del laboratorio de Fisiología y Genética Bacterianas (Poey et al., 2012). Se procuró abarcar cierta diversidad fenotípica y genotípica. Por ejemplo, se incluyó un grupo de cepas con integrones de clase 1 y/o 2, y otro carente de estos elementos genéticos pero que presentaban multirresistencia. El trabajo se centró en el estudio de la resistencia al compuesto TMP en esta subcolección de cepas de UPEC, enfocado en un análisis fenotípico y genotípico de esta resistencia. Lo más novedoso quizás de este estudio sea que todos los análisis de resistencia fenotípica a los compuestos antifolatos (TMP, SMX, SXT) se realizaron por el método de antibiótico incorporado en placa (Poey et al, 2019), análisis que generalmente se realizan siguiendo otras metodologías, siendo lo más utilizado la técnica de disco difusión. Nuestro método de incluir en el medio de cultivo una presión antibiótica permite su utilización en operaciones genéticas, como las conjugaciones realizadas en este trabajo.

Partiendo de la bibliografía, se encontró que la resistencia a TMP podría ser por mutaciones cromosomales puntuales o, más frecuentemente en Gram negativos, por genes adicionales llamados *dfr* o *dfrA*, portados en el genoma flexible, generalmente en plásmidos. Estos genes fueron numerados según el orden en que fueron encontrados (*dfrA1*, *dfrA2*,...) (Sköld 2001; Sköld 2010). Al comienzo de este trabajo, se buscaron estos genes en la base de datos, encontrándose que el más reciente era el *dfrA35*. En muchos casos se encontraron en el GenBank genes sin tener una publicación que los presentase. Más aún, dos de estos genes, *dfrA4* y *dfrA33*, no se encontraron. El gen *dfrA2* resultó ser un pseudogen en todas las anotaciones del GenBank, correspondiendo siempre a un mismo segmento de un *dfrA*. Resultó en cierta medida sorprendente la poca organización de varios de los datos encontrados, lo que parece indicar que este tema ha sido poco estudiado en forma dedicada. Un aspecto interesante de los genes *dfrA* presentes en *E. coli* es su alta similitud de secuencia (Figura 6). Dicha similitud puede ser de tal magnitud que algunos genes difieren entre sí en tan solo 7 nucleótidos, como es el caso de los genes *dfrA7* y *dfrA17*, lo que llevó a un exhaustivo diseño de cebadores específicos para cada gen, procurando siempre que los extremos 3' fueran diferentes para evitar amplificaciones cruzadas en los análisis por PCR. Esta alta similitud lleva a cuestionarse hasta qué punto son genes distintos o si corresponden a alelos de un mismo gen. Sin embargo, en este trabajo se logró la amplificación exacta de cada amplicón descrito para siete de los nueve genes presentados en la Tabla 3. De todas formas si bien la discriminación entre los genes analizados fue exitosa, no podemos descartar que pueda haber habido alguna reacción cruzada con genes *dfrA* no considerados en este trabajo.

De los restantes 32 genes *dfrA*, se buscó su presencia en la especie *E. coli*, encontrándose 22 de ellos, de los cuales 9 tuvieron 15 o más anotaciones en el GenBank (Tabla 6). Naturalmente, esta base de datos no es una muestra representativa de la realidad, no refleja la abundancia real, pero dada su gran dimensión nos brindó información muy valiosa a tener en cuenta. En estas búsquedas se constató una muy alta asociación de estos genes con integrones de clase 1 y 2 (97%) y llamó particularmente la atención su elevada presencia en cepas portadoras de ambos integrones 1 y 2 (59%).

Experimentalmente se encontraron siete de los nueve genes *dfrA* más frecuentes en *E. coli* en la subcolección de cepas de UPEC. A pesar de que el gen *dfrA12* tuvo un alto número de secuencias idénticas en *E. coli* en el GenBank (Tabla 7), no se encontró en ninguna cepa en nuestro relevamiento. Analizando más a fondo las anotaciones en el GenBank, se encontró que la mayoría provenía de aislamientos de animales; esto podría explicar la ausencia de este gen en las cepas analizadas, las cuales provenían todas de humanos. Aparecieron genes *dfrA* en 23 de las 43 cepas de UPEC. Los más frecuentes fueron el *dfrA1* y el *dfrA17*; estos dos genes han sido reportados como los más frecuentes en cepas de *E. coli* en varios estudios (Brolund et al., 2010; Al-assil et al., 2013; Lee et al., 2001; Shin et al., 2015). Además hubo tres cepas que dieron positivas para dos *dfrA* diferentes, curiosamente siendo uno de ellos siempre el *dfrA14*, en un caso junto con el *dfrA1* y en los dos restantes con el *dfrA5*. El gen *dfrA14* ya había sido reportado en coexistencia con *dfrA1* (Brolund et al, 2010). Cabe preguntarse sobre el aporte de más de un gen *dfrA* al fenotipo de resistencia a TMP, ya que estas cepas con doble *dfrA* solo mostraron niveles basales R de resistencia (Tabla 5).

Todas las cepas que tuvieron algún *dfrA* fueron fenotípicamente resistentes al TMP; en cambio no se detectó ninguno de estos genes en cepas fenotípicamente *leaky* o sensibles, lo que muestra una relación directa entre los genes *dfrA* y el fenotipo de resistencia. La cepa ATCC35218, de referencia en microbiología clínica y descrita como sensible a SXT, dio fenotipo *leaky* a TMP, negativa para *dfrA* y resistente a SMX. La otra cepa de referencia, CFT073, una UPEC cuyo genoma está secuenciado y altamente estudiado, resultó ser *leaky* para TMP y SMX, y también negativa para los *dfrA* buscados. En cuanto a las cepas resistentes a TMP y portadoras de algún *dfrA*, la gran mayoría (92%) también fue resistente a SMX y SXT. Teniendo en cuenta que este último es una combinación de los dos agentes antifolatos, el TMP y el SMX, esto indica una gran asociación de los genes *dfrA* con los genes *sul*, que determinan la resistencia a SMX. Las únicas tres cepas que fueron resistentes a TMP pero no a SXT contenían el integrón de clase 2 y el gen *dfrA1*. Concluimos que es necesario que una cepa sea fenotípicamente resistente a TMP y SMX para poder ser fenotípicamente resistente al SXT.

Puesto que el tratamiento con SXT es uno de los principales utilizados en infecciones urinarias, la dispersión conjunta de la resistencia a sus componentes individuales es explicada. Dos cepas, la 5e y la 46e, que habían sido descritas previamente como fenotípicamente resistentes a SXT (Tabla 1), resultaron sensibles en nuestros ensayos (Tabla 4). El porqué de este cambio no puede ser discutido mediante una comparación entre ambos métodos de determinación de resistencias, el de disco difusión (Poey et al., 2012) y el de antibiótico incorporado en placa realizado aquí, ya que los mismos fueron realizados con casi una década de separación. Puesto que estas dos cepas no fueron ahora resistentes a ambos compuestos por separado, TMP y SMX, la sensibilidad actual al SXT resulta justificada. Cabe destacar que más del 80% de las cepas portadoras de genes *dfrA* fueron multirresistentes según su perfil de resistencias previamente descrito (Tabla 1).

En las 18 cepas con integrones, aparecieron diferentes *dfrA* asociados al integrón 1 y siempre el *dfrA1* asociado al integrón 2; estas coexistencias no implican necesariamente ligamiento genético, un aspecto que no fue analizado en este trabajo. De todas formas, como se mencionó en la introducción, las regiones variables de ambos integrones suelen contener genes *dfrA*. La asociación de distintos *dfrA* a integrones de clase 1 ha sido objeto de escasos estudios en cepas de UPEC. Encontramos tres publicaciones centradas en este aspecto. En un trabajo se detectó la presencia del Int1 en 70 de 77 cepas resistentes a TMP portadoras de al menos un gen *dfrA* (Lee et al., 2001); otros autores encontraron genes *dfrA* en 34 de 45 cepas de UPEC Int1⁺ (Shin et al., 2015); en un tercer trabajo se halló el Int1 en 44 de 65 cepas portadoras de algún gen *dfrA* (Al-assil et al., 2013). En suma estos antecedentes indican una fuerte asociación entre los genes *dfrA* y el Int1, aunque no obligatoria. Nuestros resultados fueron coincidentes con estas observaciones.

En el grupo de las 25 cepas sin integrones, la mayoría fueron multirresistentes, entendiendo la multirresistencia como la resistencia a tres o más antibióticos de distintas familias. Considerando que la resistencia a TMP suele estar altamente asociada a otras resistencias antibióticas e incluso que la mayoría de estos genes suelen agruparse en elementos genéticos móviles, se apostó a encontrar los genes *dfrA* en cepas multirresistentes, incluso cuando fueran sensibles a SXT (Mulder et al., 2019). El resultado fue negativo, las cepas que eran sensibles a SXT (N=18), fueron siempre sensibles a TMP y carecieron de genes *dfrA*. No ocurrió lo mismo con las que eran resistentes a SXT (N=7), las cuales fueron todas resistentes a TMP y SMX por separado, y se encontraron genes *dfrA* en seis de ellas. La restante, la cepa 46p1, transfirió por conjugación su resistencia a TMP a *E. coli* K12, por lo cual asumimos que debe de tener un *dfrA* de los que no hemos analizado en este trabajo.

Hubo otra cepa de la subcolección, 70p1, que fue fenotípicamente resistente tanto a SXT como a TMP, pero a la que no se le detectó ninguno de los genes de resistencia *dfrA* buscados. En línea con esto, en la región variable del Int1 que contiene esta cepa no se había encontrado previamente ningún gen *dfrA* (Poey & Laviña, 2018). A diferencia del caso de la cepa 46p1, 70p1 no transfirió su resistencia a TMP a una *E. coli* K12. Surge entonces la pregunta de si esta cepa porta algún gen *dfrA* no analizado en este trabajo y contenido en un elemento genético no conjugable, o bien se trata de una mutación en el gen cromosómico *folA*, que confiera resistencia a TMP. Se pretendía amplificar y secuenciar el gen *folA* de esta cepa para compararlo con el de *E. coli* K12 y buscar posibles mutaciones que explicasen el fenotipo de resistencia. La dilucidación de esta alternativa no fue posible por el surgimiento de la pandemia.

Los resultados de los experimentos de conjugación permiten suponer con toda seguridad que muchos de estos genes *dfrA* detectados por PCR se encontraban en plásmidos conjugativos, ya que se obtuvieron transconjugantes resistentes a TMP. De 20 cepas donantes resistentes al mismo, ocho dieron lugar a la aparición de clones seleccionados por su resistencia a este antibiótico. En cambio, ninguna de las cepas de UPEC de fenotipo *leaky* a TMP pudo dar lugar a aparición de clones resistentes. En principio las colonias crecidas en el cross-streaking deben de ser transconjugantes que recibieron un plásmido conjugativo con algún gen *dfrA*. Se llegó a purificar varias de estas colonias transconjugantes, pero el trabajo no pudo continuar por las razones antes expuestas. A pesar de que nuestra subcolección no es una muestra representativa de la realidad por los criterios empleados para su selección, queda en evidencia que los genes *dfrA* pueden estar en plásmidos conjugativos y por tanto pueden transferirse horizontalmente por conjugación con una frecuencia considerable, similar a la hallada por otros autores (Lee et al., 2001).

Otro aspecto interesante en estos experimentos de conjugación es que se obtuvieron transconjugantes dejando tiempo cero de conjugación, ya que donantes y receptoras se juntaron sobre una placa que ya contenía las dos presiones antibióticas, de selección y contraselección. Es sabido que el plásmido F transfiere segmentos de ADN a una velocidad de 47 kb/min en *E. coli* K12 (Miller, 1992). Sin embargo, no hemos encontrado estudios que determinen la velocidad de transferencia conjugativa de otros plásmidos en otras cepas. Por lo tanto, lo único que podemos asegurar es que en tiempo cero, las cepas de UPEC donantes lograron transferir plásmidos conjugativos de tipo R a *E. coli* K12. Este tipo de plásmidos varía en tamaño entre los 100 y 250 kb. En base a esto, se puede suponer que los plásmidos transferidos en los ocho casos serían los de menor tamaño dentro de este rango, y no podemos descartar que en otras condiciones, con tiempos de conjugación superiores pudiesen aparecer transconjugantes a partir de otras cepas donantes.

VI. Conclusiones

En este trabajo se pudo determinar la resistencia a trimetoprim y a sulfametoxazol por separado, empleando estos antibióticos incorporados en medio sólido. Como era previsible, hemos podido comprobar que la resistencia en *E. coli* al compuesto co-trimoxazol (SXT), es posible únicamente cuando existe resistencia a ambos de sus componentes, TMP y SMX, por separado. Esto supone una relación directa en la dispersión de los genes que confieren resistencia a cada uno de estos compuestos. Los genes que confieren resistencia a TMP, *dfrA*, pertenecen al genoma flexible de *E. coli*, estando muy asociados a integrones, y su dispersión se ve favorecida por el fenómeno de transferencia horizontal. Se aportan datos que apoyan la idea de que existe una estrecha relación entre la resistencia a TMP y a SMX, con los integrones de clase 1 y 2.

VII. Perspectivas

Como se mencionó anteriormente, algunos experimentos genotípicos no pudieron ser culminados debido al surgimiento de la pandemia de COVID-19. Los resultados de los mismos significarían un gran aporte al conocimiento de la resistencia a TMP. En primer lugar, la verificación de la presencia de los genes *dfrA* provenientes de las cepas donantes en los transconjugantes obtenidos, lo cual seguramente será imprescindible para el estudio del efecto fenotípico individual de cada gen. En segundo lugar, la secuenciación del gen cromosómico *folA* en la cepa 70p1 para determinar si se trata de un mutante cromosómico, así como también el estudio del mismo en las cepas con fenotipos *leaky* fuertes. Es de particular interés extender los estudios realizados a toda la colección de cepas de UPEC del laboratorio, a modo de obtener resultados con valor epidemiológico, i.e. representativos de la realidad. Este trabajo también abre perspectivas sobre la localización y distribución de los genes *dfrA* a nivel general. Debido a la relación antes mencionada entre las resistencias a TMP y a SMX, y con la presencia de integrones de clase 1 y 2, resulta muy atractivo el estudio conjunto de estos atributos en toda la colección de UPEC.

VIII. Referencias

1. Azpiroz M.F., Poey M.E., Laviña M. Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 47 (2009) 274–280.
2. Bermingham A, Derrick J. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays* 24(2002): p.637–648.
3. Bryce A, Hay AD, Lane IF, Thornton HV, Wootton M, Costelloe C. Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*.(2016)
4. Cambray G, Guerout A, Mazel D. Integrons. *Annual review of genetics*, 44, (2010) p.141-166.
5. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucl. Acids Res.*, 16 (22), (1988) p.10881-10890.
6. Cortés F, Hirsch B.S., de la Maza M.P. Importancia del ácido fólico en la medicina actual. *Revista médica de Chile*, 128(2), (2000) p.213-220.
7. Huovinen P. Trimethoprim resistance. Minireview. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (1987) p.1451-1457.
8. Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial resistance*, (2001) p.1608-1614.
9. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews*. Volume 2 (2004) p.123-140.
10. Kielhofner M. Trimethoprim-Sulfamethoxazole: Pharmacokinetics, clinical use and adverse reactions. *Texas heart institute journal*. Update on antimicrobial agents, volume 17 (2), (1990) p.86-93.
11. Labbate M., Case R.J., Stokes H.W. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Meth. Mol. Biol.* 532 (2009) p.103–125.
12. Lee J.C., Oh J.Y., Cho J.W., Park J.C., Kim J.M., Seol S.Y., Cho D.T. The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *Antimicrob Chemother* (5):599-604 (2001).
13. Miller, J. H. *A Short Course in Bacterial Genetics – A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor (1992). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN: 0–87969-349–5. *J. Basic Microbiol*, 33: 278-278.

14. Mulder M., Verbon A., Lous J., Goessens W., Stricker B.H. Use of other antimicrobial drugs is associated with trimethoprim resistance in patients with urinary tract infections caused by *E. coli*. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38 (12), (2019) p.2283–2290.
15. Neidhardt F.C., Curtiss R. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, D.C: ASM Press, (1996). Print.
16. Partridge S.R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 35(5), (2011) p.820-55.
17. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (4) (2018), p.88-17.
18. Poey M.E., Laviña M. Horizontal transfer to class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microbial Pathogenesis* 117 (2018) p.16-22.
19. Poey M.E., Laviña M. Integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and their relationship with phylogeny and virulence. *Microbial pathogenesis* 77 (2014) p.73-77.
20. Poey M.E., Azpiroz M.F., Laviña M. On sulfonamide resistance, sul genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis* 135 (2019) p.1-7.
21. Poey M.E., Albin M., Saona G., Laviña M. Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities. *Microbial pathogenesis* 52 (2012) p.292-301.
22. Ramírez M.S., Piñeiro S., Centrón, D. Novel Insights about Class 2 Integrons from Experimental and Genomic Epidemiology. Argentinian Integron Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (2) (2010), p.699-706.
23. Shin H.W, Lim L., Kim S., Kim J., Kwon G.C., Koo S.H. Characterization of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in Gram-negative bacilli. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(1) (2015), p.137-142.
24. Sköld O. Sulfonamides and trimethoprim. *Expert Reviews. Anti. Infect. Ther.* 8(1) (2010), p.1-6.
25. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research, BioMed Central*, 32 (3-4), (2001), p.261-273.
26. Woodford N. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 (2005) Suppl 3:2-21.
27. Zhang A.N., Li-Guan L., Liping M., Gillings M.R., Tiedge J.M., Zhang T. Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome* 130 (6) (2018).