



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Universidad de la República**

**PEDECIBA BIOLOGÍA**

**Microbiología**

**Tesis de Maestría**

# **Resistencia a sulfamidas y los integrones de clase 1**

**Lic. Eliana de los Santos Silva**

**Sección Fisiología y Genética Bacterianas  
Facultad de Ciencias  
Montevideo  
Uruguay  
2022**

Tribunal:

Dra. Teresa Camou (Presidente)

Dra. Silvia Batista (Vocal)

Dra. Susana Castro (Vocal)

Orientador:

Dra. Ma. Eloísa Poey

Co-orientador:

Dra. Magela D. Laviña

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Eloísa Poey, mi orientadora, y a Magela Laviña, mi co-orientadora, por haberme otorgado una sólida formación en el área de Microbiología. Asimismo, por brindarme un apoyo constante y dedicación en la guía de este trabajo junto con valiosas instancias de discusión de los resultados obtenidos.

A mi compañera de laboratorio, Fernanda Azpiroz por su colaboración en etapas de discusión de resultados, así como su constante apoyo y momentos compartidos. A los que ya no forman parte de la Sección pero que formaron parte del viaje: Alicia Parente, Valeria Flórez y Diego Aznárez. A Gabriela García del MSP por su apoyo en el entendimiento de aspectos de la Microbiología Clínica.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas por permitirme realizar mi Maestría.

A los miembros del tribunal, Teresa Camou, Silvia Batista y Susana Castro, por haber leído la tesis con meticulosidad, agradeciendo sus sugerencias y aportes.

A mi familia, en especial a mi mamá, por las arduas horas que pasaba al teléfono escuchándome hablar de mis resultados por más que no entendiera nada.

## RESUMEN

El incremento de las bacterias patógenas multirresistentes es un tema de preocupación en salud porque éstas generan infecciones de difícil tratamiento. Los integrones de clase 1 (Int1) son elementos genéticos que contribuyen a este problema y se encuentran diseminados en algunos grupos taxonómicos de bacterias Gram-negativas. Contienen en su región variable distintos genes de resistencia antibiótica, frecuentemente *dfrA*, de resistencia a trimetoprim, y en su plataforma conservada el gen *sulI*, de resistencia a sulfamidas. Los antibióticos trimetoprim (TMP) y sulfamidas (e.g. sulfametoxazol, SMX) actúan bloqueando la síntesis del ácido fólico, por lo que se les denomina antifolatos. En la clínica, su combinación, llamada co-trimoxazol (SXT), es ampliamente usada.

En este trabajo se realizó un estudio sistemático de una colección de 230 aislamientos clínicos de *Escherichia coli* uropatógeno con los siguientes objetivos: i) analizar su fenotipo de susceptibilidad a los antifolatos SMX, TMP y SXT, ii) determinar las bases genéticas de la resistencia a SMX, relevando los genes móviles *sulI*, 2 y 3, responsables de la resistencia a sulfamidas, iii) correlacionar los datos fenotípicos y genotípicos con la presencia del Int1 y iv) determinar la influencia de los genes *sul* en la transferencia horizontal de los Int1.

La prevalencia de la resistencia a SMX, TMP y SXT fue de 54%, 46% y 44%, respectivamente. Todas las cepas resistentes a SMX portaron un gen *sul* a excepción de tres, en las que las bases genéticas de este fenotipo no se pudieron identificar. Todas las cepas catalogadas previamente como Int1<sup>+</sup> (50) -por presentar el gen de la integrasa *intI1*- fueron SMX<sup>R</sup>: la mayoría tuvo *sulI* solo o con *sul2* o *sul3*, otras tuvieron solo *sul2*, y una careció de genes *sul*. Aunque el gen *sulI* se detectó en 16 cepas carentes del gen de la integrasa *intI1*, se encontró que todas ellas contenían otras secuencias de Int1, indicando que *sulI* no existiría independientemente de este tipo de integrón. Se propone así que *sulI* es un marcador de la presencia del Int1, al igual que el gen *intI1*. Siguiendo este criterio, la prevalencia del Int1 en nuestra colección se incrementó del 22% (50 *intI1*<sup>+</sup>) al 29% (66 *intI1*<sup>+</sup> y/o *sulI*<sup>+</sup>). Las 66 cepas Int1<sup>+</sup> fueron SMX<sup>R</sup> y de ellas 63 fueron también TMP<sup>R</sup>.

En los experimentos de transferencia horizontal, se transfirieron plásmidos naturales con un Int1 entre estirpes derivadas de *E. coli* K12, por conjugación. Las donantes tenían el plásmido y las receptoras tenían distintos genes *sul* en forma recombinante. Se identificaron tres contextos receptores particularmente permisivos para el establecimiento del integrón, *sul2*<sup>+</sup>,

*qacEA-sul1*<sup>+</sup> y *sul3*<sup>+</sup>, y dos contextos particularmente restrictivos, *sul*<sup>-</sup> y *sul1*<sup>+</sup>. El mayor contraste se manifestó bajo la presión selectiva con sulfamida (incluida en SXT), con el crecimiento o no de transconjugantes. Bajo otras presiones selectivas, la diferencia apareció como una tendencia en los cruzamientos con uno de los plásmidos. Considerando que las presiones selectivas empleadas correspondían a resistencias codificadas por los plásmidos Int1 transferidos, y que estas últimas no fueron suficientes para que los transconjugantes crecieran en todos los contextos, se deduce que existen limitaciones aún desconocidas para el establecimiento de los Int1 luego de ser transferidos horizontalmente. Estas limitaciones fueron superadas por la provisión de información *sul* en las receptoras, i.e. por un suplemento de dihidropteroato sintetasas resistentes a sulfamidas. Esto sugiere que hay una necesidad de reforzar la vía de síntesis del ácido fólico en su primera etapa enzimática cuando ingresa el integrón. Tal vez este tipo de fenómeno sea una pista para entender la distribución acotada de los integrones de clase 1 en el mundo bacteriano.

## **PALABRAS CLAVE**

Resistencia a sulfamidas; Síntesis de ácido fólico; Integrones de clase 1; Transferencia horizontal de genes

## **ABREVIATURAS**

Int1	Integrón de clase 1
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógeno
AMP	Ampicilina
CHL	Cloranfenicol
TMP	Trimetoprim
SMX	Sulfametoxazol
SXT	Co-trimoxazol
CH	“ <i>Children</i> ”
PW	“ <i>Pregnant Woman</i> ”

## TABLA DE CONTENIDOS

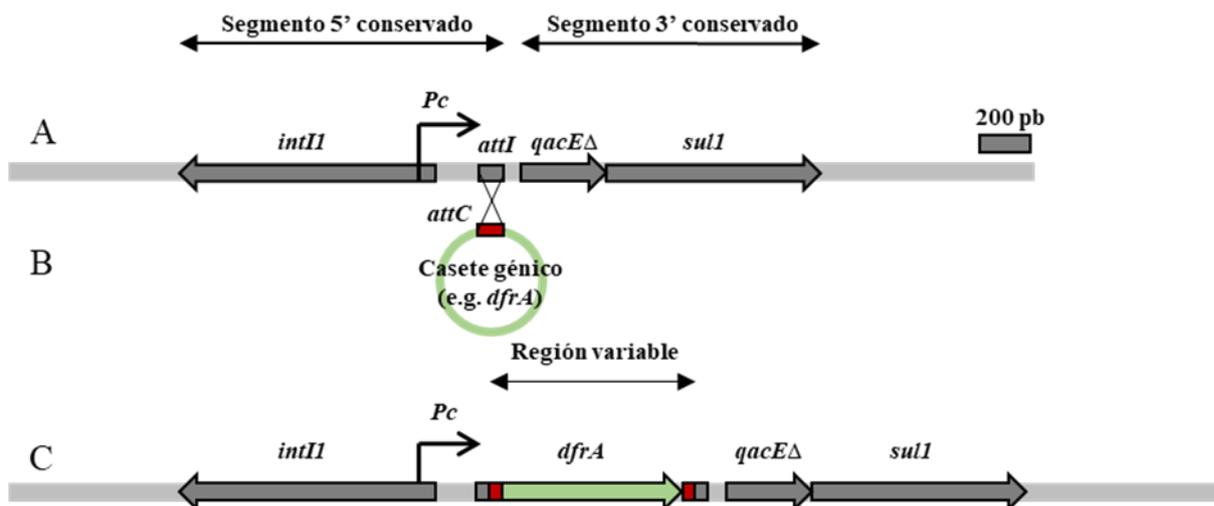
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1.</b>	<b>Integrones de clase 1</b>	
<b>I.2.</b>	<b>Susceptibilidad a los antifolatos</b>	
<b>I.3.</b>	<b>Antecedentes específicos del grupo de trabajo</b>	
<b>I.3.1.</b>	<b>Caracterización de una colección de cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatógeno</b>	
<b>I.3.2.</b>	<b>Medio sólidos con antibiótico incorporados</b>	
<b>I.3.3.</b>	<b>Transferencia horizontal de los integrones de clase 1</b>	
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>II.1.</b>	<b>Hipótesis</b>	
<b>II.2.</b>	<b>Objetivo general</b>	
<b>II.3.</b>	<b>Objetivos específicos</b>	
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>III.1.</b>	<b>Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo</b>	
<b>III.2.</b>	<b>Amplificaciones PCR</b>	
<b>III.3.</b>	<b>Clonado de los genes <i>sul</i> y <i>folP</i></b>	
<b>III.4.</b>	<b>Transformación de <i>E. coli</i> K12</b>	
<b>III.5.</b>	<b>Conjugación entre estirpes de <i>E. coli</i> K12</b>	
<b>III.6.</b>	<b>Secuenciación</b>	
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Susceptibilidad a los antifolatos</b>	
<b>IV.2.</b>	<b>Relevamiento de los genes <i>sul</i></b>	
<b>IV.3.</b>	<b>El gen <i>sull</i> es un marcador del integrón de clase 1</b>	
<b>IV.4.</b>	<b>Cepas resistentes a sulfamidas que carecen de genes <i>sul</i></b>	
<b>IV.5.</b>	<b>Transferencia del integrón de clase 1 por conjugación</b>	
<b>IV.5.1.</b>	<b>Construcción de estirpes de <i>E. coli</i> K12 con plásmidos recombinantes portadores de genes <i>sul</i></b>	
<b>IV.5.2.</b>	<b>Conjugación del integrón de clase 1 desde <i>E. coli</i> K12 Int1<sup>+</sup> a <i>E. coli</i> K12 con plásmidos recombinantes portadores de genes <i>sul</i></b>	
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>VII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>31</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>32</b>
	<b>APÉNDICE I: Figuras</b>	<b>35</b>
	<b>APÉNDICE II: Medio de cultivo</b>	<b>39</b>
	<b>ANEXO: Mapa físico y genético del plásmido pUCYC5</b>	<b>40</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La aparición de clones bacterianos multirresistentes es un tema de gran preocupación a nivel clínico. El uso indebido y excesivo de los antibióticos ha provocado una situación mundial en la que las infecciones se han tornado cada vez más difíciles de combatir ya que las bacterias que las ocasionan son resistentes a estos [Exner et al. 2017; World Health Organization, 2021a]. Sin duda, la presión antibiótica es una fuerza selectiva importante en la evolución y propagación de las resistencias ya que promueve la proliferación de aquellos clones resistentes. Sin embargo, es importante señalar que en la naturaleza se han detectado resistencias incluso hacia antibióticos sintéticos que no han sido comercializados. Cabe mencionar un estudio realizado a partir de aislamientos procedentes de una muestra de microbioma de una cueva que estuvo aislada por más de 4 millones de años. En el mismo se evidenció que dichos aislamientos fueron resistentes a diferentes antibióticos de uso comercial, incluso a varios antibióticos en forma simultánea [Bhullar et al., 2012]. Además de lo mencionado, no debemos olvidar que la prevalencia de las resistencias no sólo se debe a la expansión clonal, sino también a la generación de nuevos clones capaces de adquirirlas por los mecanismos de transferencia horizontal de genes, i.e. conjugación, transducción y transformación [Exner et al., 2017]. En vista de esta problemática global, en los últimos años la comunidad científica ha tratado de concientizar a la población para lograr un uso responsable y coordinado de los antibióticos que abarque las áreas de la salud humana, animal y del medio ambiente, en una concepción denominada “Una Salud” [Wernli et al., 2020; World Health Organization, 2019].

### I.1. Integrones de clase 1

Los integrones son elementos genéticos que se caracterizan por integrar distintos genes en su interior por un proceso de recombinación específica de sitio. Estos pueden dividirse en dos grandes categorías, los integrones ambientales y los clínicos, dependiendo de donde se haya obtenido la muestra. Dentro de los integrones clínicos se encuentran los de clase 1 y 2, que portan genes de resistencia antibiótica. Los integrones de clase 1 (Int1) son los más frecuentes en aislamientos clínicos y a ellos nos dedicaremos en este trabajo. Constan de una plataforma conservada, dividida en dos porciones (5' y 3') que flanquean una región variable (**Fig. 1**). El segmento 5' de la plataforma conservada contiene el gen de la integrasa, *intI*, un sitio de recombinación *attI*, y el promotor *Pc*. La integrasa es capaz de integrar, por recombinación



**Fig. 1. Estructura general de un Int1 e integración de un casete génico.** A) Int1 sin un casete: en el segmento 5' conservado se encuentra el gen para la integrasa, *intI1*, el promotor *Pc* y el sitio de recombinación *attI*; en el segmento 3' se encuentra el operón *qacEΔ sulI*. B) Casete génico portador de un gen de resistencia antibiótica, e.g. *dfrA*, de resistencia a trimetoprim, y su sitio de recombinación *attC*. C) Int1 con el casete génico integrado, que constituye la región variable.

específica de sitio, marcos abiertos de lectura denominados casetes génicos. Éstos son moléculas circulares no replicativas que están formadas por un sitio de recombinación *attC* y un gen que suele ser de resistencia antibiótica. Al integrarse, el gen portado por el casete queda bajo el influjo del promotor *Pc* del integrón. El segmento 3' está compuesto por el operón que consta de dos genes: *qacEΔ*, un gen deletado de resistencia a amonio cuaternario, y *sulI*, un gen de resistencia a sulfamidas. Cabe aclarar que, aunque no esté así descrito, consideramos que ésta es una unidad transcripcional porque los dos genes se solapan 7 nucleótidos. La región variable está constituida por los casetes génicos que el integrón haya adquirido, existiendo así diferentes variantes del integrón [Leverstein-van Hall et al., 2003; Labbate et al., 2009; Cambray et al., 2010; Jove et al., 2010]. Los Int1 suelen contener pocos genes de resistencia en su región variable. En este sentido, en un relevamiento de la literatura mundial sobre la estructura de los Int1 en 72 especies de 74 países, se señala que los genes de la región variable confieren predominantemente resistencia a trimetoprim (genes *dfrA*) y/o estreptomicina (genes *aadA*) [Domingues et al., 2015; Sunde et al., 2015; Poey & Laviña, 2018; Zhang et al., 2018]. Este tipo de integrones puede estar localizado en el cromosoma bacteriano o en plásmidos; estos últimos suelen ser conjugativos y de tipo R (resistencia). Las resistencias plasmídicas suelen exceder las portadas por el Int1, por lo que los Int1 no solo contribuyen a la resistencia, sino que también serían marcadores de loci de multiresistencia [Partridge, 2011; Domingues et al., 2015; Poey & Laviña, 2018].

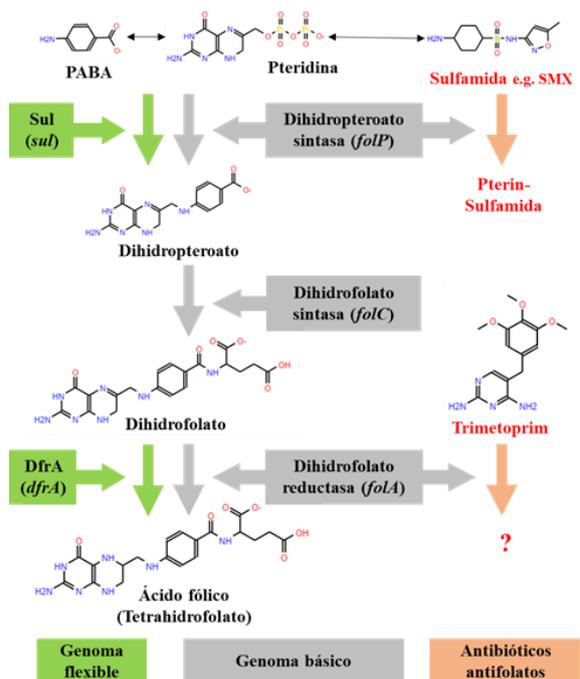
La prevalencia de los Int1 está acotada a ciertos grupos filogenéticos dentro de las Gamma-proteobacterias. Más concretamente, se los encuentra en cepas de las familias:

Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Moraxellaceae. Resulta llamativo observar que los Int1 no solo presentan limitaciones en la diversidad de genes que portan en su región variable, sino que también presentan limitaciones para su diseminación. En este sentido, cabe notar que los plásmidos que portan estos integrones con frecuencia son capaces de transgredir barreras taxonómicas, por lo que debe existir algún tipo de limitación adicional para la transferencia horizontal de estos elementos [Zhang et al., 2018].

## I.2. Susceptibilidad a los antifolatos

En vista de lo anterior, existe una estrecha vinculación entre los Int1 y la vía de síntesis del ácido fólico. Los Int1 portan en su plataforma conservada el gen *sulI*, de resistencia a sulfamidas, y en su región variable, con alta frecuencia, el gen *dfrA*, de resistencia a trimetoprim. Las sulfamidas y el trimetoprim son antibióticos que inhiben la vía de síntesis del ácido fólico (vía Fol), por lo que se les denomina antifolatos.

El ácido fólico es una coenzima esencial involucrada en reacciones de transferencia de unidades de un carbono necesarias en la síntesis de purinas, metionina y glicina, entre otros. Las células de mamíferos adquieren el folato (vitamina B9) de la dieta, mientras que las bacterias deben sintetizar el ácido fólico de novo ya que carecen de los mecanismos necesarios para su captación. Esta característica diferencial hace que la vía de síntesis del ácido fólico sea un blanco clave para la antibioterapia. Esta vía involucra tres enzimas que actúan secuencialmente: i) la dihidropteroato sintasa, ii) la dihidrofolato sintasa y iii) la dihidrofolato reductasa, codificadas por los genes *folP*, *folC* y *folA*, respectivamente (**Fig. 2**) [Neidhardt, 1996; Green & Matthews, 2007]. Dos de las enzimas de esta vía, la primera y la última, son blanco de los antifolatos. Las sulfamidas, e.g. sulfametoxazol (SMX), comprenden una familia de antibióticos sintéticos, que inhiben la enzima dihidropteroato sintasa. Estos antibióticos actúan como análogos metabólicos del sustrato natural de la enzima, el ácido para-aminobenzoico (PABA). Por otro lado, el trimetoprim (TMP), un antibiótico también sintético, es un análogo metabólico del dihidrofolato y actúa bloqueando la enzima dihidrofolato reductasa [Neidhardt, 1996]. Cada antibiótico ejerce un efecto bacteriostático y su uso combinado tiene un efecto sinérgico [Minato et al., 2018]. En la clínica se usa la fórmula combinada de SMX-TMP, denominada co-trimoxazol (SXT), para el tratamiento de diversas infecciones, principalmente las urinarias, y como profiláctico en pacientes con VIH [Neidhardt, 1996; World Health Organization, 2021b].



**Fig. 2. Vía de síntesis del ácido fólico.** Con letra negra, se indican los intermediarios metabólicos de la vía Fol y su producto final. En cuadro gris, las enzimas participantes, codificadas por el genoma básico. A la derecha se indican los inhibidores de la vía y sus productos derivados. A la izquierda en verde, se señalan las enzimas codificadas por el genoma flexible capaces de restablecer la vía Fol en presencia de sus inhibidores. PABA, ácido para-aminobenzoico; Sul, dihidropteroato sintasa resistente a sulfamidas; DfrA, dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprim; SMX,

El prontosil fue la primera sulfamida de uso sistémico sintetizada por el hombre en la década de 1930. Si bien era un antimicrobiano de amplio espectro, sus efectos adversos junto con la aparición de clones resistentes hicieron que su uso se limitase. Por otro lado, el TMP se comenzó a utilizar en la década de 1960, y su combinación con SMX, el SXT, unos años después [Sköld, 2001; Huovinen, 2001].

Las resistencias a SMX y TMP se deben principalmente a uno de los siguientes mecanismos: i) mutaciones espontáneas en los genes *folP* y *folA* que provocan que las enzimas que codifican disminuyan su afinidad por sus inhibidores, y ii) la presencia de genes móviles que codifican variantes enzimáticas resistentes a estos antibióticos (genes *sul* y *dfrA*). Este último mecanismo es el más frecuente en bacterias Gram negativas y se vincula fuertemente a los integrones clínicos [Neidhardt, 1996]. En estos organismos, la resistencia a sulfamidas está mayoritariamente codificada por los genes móviles *sul1*, 2 y 3. El gen *sul1*, como se mencionó, forma parte de la plataforma conservada del Int1, lo que indica una relación estrecha con dicho integrón. Sin embargo, su presencia no sería obligatoria ya que hay descripciones de variantes de Int1 que carecen de este gen [Dawes et al., 2010; Zhang et al., 2018]. El gen *sul2* no parece estar ligado a los Int1, pero suele estar incorporado en plásmidos, y el gen *sul3* es raro y se ha visto asociado con Int1, incluso sustituyendo al gen *sul1* [Antunes et al., 2005]. Cabe mencionar que en el 2017 se describió un nuevo gen, *sul4*, detectado en análisis metagenómicos de muestras ambientales [Razavi et al., 2017]. Según todo lo anterior, cabe pensar que los Int1 serían estructuras capaces de restaurar la vía de síntesis del ácido fólico en presencia de sus inhibidores. En este trabajo se estudiaron las bases genéticas de la resistencia a las sulfamidas.

### **I.3. Antecedentes específicos del grupo de trabajo**

#### **I.3.1. Caracterización de una colección de cepas de *Escherichia coli* uropatógeno**

En los últimos años, nuestro equipo de trabajo ha realizado la caracterización fenotípica y genotípica de una colección de 230 cepas de *Escherichia coli* uropatógeno (UPEC) procedentes de mujeres embarazadas y de niños con anomalías en el tracto urinario. Dichos aislamientos fueron colectados siguiendo un diseño epidemiológico. Entre los análisis realizados, se estudió la resistencia antibiótica y la presencia de integrones clínicos (por el criterio de presentar el gen correspondiente de la integrasa). Se detectó que 50 aislamientos (22%) fueron Int1<sup>+</sup> y 19 (8%) presentaron el integrón de clase 2. De las distintas variantes de promotor *Pc*, *PcH1* y *PcW* fueron las más frecuentemente halladas [Poey et al., 2012; Poey & Laviña, 2014]. De las 50 cepas Int1<sup>+</sup> se analizó la región variable y la presencia de genes *sul* en 45 de ellas. En cuanto a la región variable los genes predominantes fueron *dfrA* y *aadA*, en sus diferentes variantes. Todas las cepas Int1<sup>+</sup> fueron resistentes a SMX y presentaron al menos un tipo de gen *sul*; 21 tuvieron sólo *sul1*, 15 *sul1* y *sul2*, 1 *sul1* y *sul3*, y 8 sólo *sul2* [Poey & Laviña, 2018].

#### **I.3.2. Medios sólidos con antifolatos incorporados**

En Microbiología Clínica, la susceptibilidad a SMX y TMP no se analiza por separado, pero sí se prueba de forma rutinaria a su combinación, SXT, mediante el método de disco-difusión (directrices del “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”).

En nuestro laboratorio se puso a punto un método de análisis de la susceptibilidad a los antifolatos en medio sólido con la adición de los antibióticos SMX, TMP y SXT. Esta técnica no sólo permite identificar los aislamientos resistentes, sino que también genera la posibilidad de seleccionar clones resistentes a estos compuestos en experimentos genéticos. Las concentraciones de antibióticos empleadas se presentan en la sección de Materiales y Métodos. Cabe aclarar que la distinción entre cepas resistentes y sensibles al SMX y al TMP no es absoluta: las cepas sensibles presentan un crecimiento tenue, basal, conocido como crecimiento “*leaky*”. Por el contrario, en placas con SXT la diferencia entre clones resistentes y sensibles es bien clara, entre crecimiento y no crecimiento, respectivamente [Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019].

### I.3.3. Transferencia horizontal de los integrones de clase 1

Los Int1, como integrantes del genoma flexible, no sólo se diseminan en forma clonal, sino que también lo hacen mediante transferencia horizontal. Si bien existen muchos relevamientos de la presencia de integrones clínicos en la literatura, el análisis de su transferencia horizontal es particularmente escaso. Nuestro grupo se ha dedicado en los últimos años al estudio de la transferencia de estos elementos por conjugación [Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019]. En este sentido, había llamado la atención que los Int1 no se distribuyeran de forma azarosa en nuestra colección de cepas de UPEC, sino que se concentraran en cepas con determinados perfiles de virulencia [Poey et al., 2012]. Estos resultados generaron la interrogante de si podrían existir distintos contextos genéticos para la transferencia y/o establecimiento de los Int1 dentro de la especie de *E. coli*. Para responder esta interrogante, se realizaron ensayos de transferencia horizontal del Int1 usando como donantes 45 cepas Int1<sup>+</sup>, de la colección de UPEC antes mencionada y, como receptora, una cepa de *E. coli* K12. Por conjugación el Int1 se transfirió en 18 casos y en un solo caso por transducción; de este modo se generó una colección de 19 cepas de *E. coli* K12 portadoras de distintos plásmidos Int1<sup>+</sup>. Se analizaron diferentes variables que pudieran condicionar la transferencia del Int1 sin encontrarse ninguna correlación estricta. Sin embargo, la presencia del gen *sul2* en la cepa donante pareció facilitar la transferencia del Int1 [Poey & Laviña, 2018].

Un aspecto novedoso a destacar es que en el contexto de *E. coli* K12 los genes *sul* determinaron diferentes niveles de resistencia a SMX: *sul2* y *sul3* confirieron una resistencia claramente mayor que *sul1*. Por el contrario, en las cepas naturales de UPEC no se observó esta diferencia [Poey & Laviña, 2018].

Al disponer de una colección de *E. coli* K12 con plásmidos Int1<sup>+</sup>, se pudieron realizar conjugaciones entre estas cepas como donantes del Int1 y una *E. coli* K12 como receptora. El resultado a destacar de estos experimentos fue que, según el tipo de gen *sul* portado por el plásmido Int1<sup>+</sup> y según los antibióticos empleados para la selección de transconjugantes Int1<sup>+</sup>, se obtuvieron o no clones resultantes. Siempre hubo transconjugantes en las selecciones con ampicilina o TMP. Esto no fue así cuando se empleó SMX o SXT: no crecieron transconjugantes si el plásmido portaba únicamente *sul1*, incluso hasta después de 72 h de incubación. Sin embargo, cuando el plásmido Int1<sup>+</sup> portaba *sul2* se observaron miles de transconjugantes en dichas selecciones a las 24 h. Curiosamente, las cepas portadoras de plásmidos naturales Int1<sup>+</sup> con sólo *sul1*, después de ser seleccionadas con otros antibióticos, sí pudieron crecer y formar estrías en placas con SMX. Es decir, los transconjugantes que

recibieron un plásmido  $Int1^+ sulI^+$ , recién generados (*naïfs*), no fueron viables en presencia de SMX. En vista de lo anterior, los genes *sul* portados por la cepa donante, así como la presión antibiótica ejercida por el medio condicionarían la transferencia de los *Int1* [Poey et al., 2019].

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### II.1. Hipótesis

Existirían distintos contextos genéticos bacterianos, desde permisivos hasta refractarios, para la transferencia horizontal de los Int1. Concretamente, la presencia de los distintos genes *sul* influiría en el establecimiento y permanencia del Int1, un fenómeno que también estaría condicionado por la presencia de sulfamidas en el medio.

### II.2. Objetivo general

Analizar la vinculación de la resistencia a sulfamidas con la presencia de los integrones de clase 1 y con la transferencia horizontal de estos elementos genéticos en presencia de diferentes presiones antibióticas.

### II.3. Objetivos específicos

- Completar el análisis fenotípico de la resistencia a los antifolatos en la colección de UPEC del laboratorio.
- Completar el relevamiento de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* en la colección de UPEC.
- Correlacionar los datos fenotípicos y genotípicos con la presencia del Int1.
- Clonar los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, por separado, en un vector plasmídico.
- Evaluar el nivel de resistencia conferido a *E. coli* K12 por los distintos genes *sul* clonados.
- Realizar conjugaciones entre estirpes donantes de *E. coli* K12 Int1<sup>+</sup> *sul1*<sup>+</sup> con estirpe receptoras de *E. coli* K12 Int1<sup>-</sup> portadoras de los genes *sul1*, *sul2* o *sul3* clonados, seleccionando los transconjugantes con antifolatos.
- Corroborar la condición de transconjugantes del integrón mediante análisis genotípicos y fenotípicos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Se empleó una colección de 230 aislamientos de UPEC obtenida del Centro Hospitalario Pereira Rossell, siguiendo un diseño epidemiológico, entre 2007 y 2009. Las cepas proceden de dos tipos de pacientes con infecciones en el tracto urinario: 112 de mujeres embarazadas y 118 de niños. Proviene de urocultivos positivos para *E. coli* con alto recuento de colonias y/o de pacientes con historia clínica de infección urinaria. Los aislamientos fueron caracterizados para su filogenia, virulencia, resistencia antibiótica y presencia de integrones clínicos [Poey et al., 2012; Poey & Laviña, 2014]. Se emplearon estirpes de *E. coli* K12 en experimentos de transformación y conjugación (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Estirpes de *E. coli* K12 y plásmidos empleados**

Bacteria/plásmido	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>E. coli</i> K12		
DH5 $\alpha$	<i>lacZ</i> $\Delta$ M15 ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 gyrA96 hsdR17 endA1 supE44 thi-1 relA1</i>	Miller et al., 1992
W3110	salvaje	Miller et al., 1992
BZB1011 <i><math>\Delta</math>hsdR::kan</i>	mutante espontáneo <i>gyrA</i> de W3110; deficiente para el sistema de restricción por la mutación <i><math>\Delta</math>hsdR748::kan</i> . NAL <sup>R</sup> y KAN <sup>R</sup> .	CGSC 11083, Coli Genetic Stock Center Poey & Laviña, 2018
Plásmidos		
pUCYC5	replicon p15A (entre 12-15 por cromosoma bacteriano), <i>lacZ'</i> <i>cat</i> . CHL <sup>R</sup> .	Azpiroz et al., 2009
pINT11	pUCYC5 con Int1 ( <i>PcW-P2</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> ). STR <sup>R</sup> , SMX <sup>R</sup> y CHL <sup>R</sup> .	Poey et al., 2019
p10 <sub>CH</sub>	plásmido natural de UPEC con replicón FIB FII y un Int1 ( <i>PcHI dfrA17 aadA5 sul1</i> ). AMP <sup>R</sup> , STR <sup>R</sup> , SMX <sup>R</sup> y TMP <sup>R</sup> .	Poey & Laviña, 2018
p48-1 <sub>CH</sub>	plásmido natural de UPEC con replicón L/M y un Int1 ( <i>PcW dfrA15b cmlA1 aadA2 sul1</i> ). TMP <sup>R</sup> y SMX <sup>R</sup> .	Poey & Laviña, 2018
p27 <sub>CH</sub>	plásmido natural de UPEC con replicón FIB FII, <i>sul2</i> y un Int1 ( <i>PcHI</i> , región variable desconocida). AMP <sup>R</sup> , STR <sup>R</sup> , SMX <sup>R</sup> y TMP <sup>R</sup> .	Poey & Laviña, 2018
p73-2 <sub>CH</sub>	plásmido natural de UPEC con replicón FII, <i>sul3</i> y un Int1 ( <i>PcHI</i> , <i>dfrA1 aadA1 sul1</i> ). Confiere STR <sup>R</sup> , TET <sup>R</sup> , SMX <sup>R</sup> y TMP <sup>R</sup> .	Poey & Laviña, 2018
psul1L	pUCYC5 con la plataforma conservada 3' de Int1 (portadora del operón <i>P-qacEA-sul1</i> ). CHL <sup>R</sup> , TMP <sup>R</sup> y SMX <sup>R</sup> .	Este trabajo
psul1S	pUCYC5 con el gen <i>sul1</i> (incluyendo su Shine-Dalgarno). CHL <sup>R</sup> y SMX <sup>R</sup> .	Este trabajo
psul2	pUCYC5 con el gen <i>sul2</i> (incluyendo su S-D). CHL <sup>R</sup> y SMX <sup>R</sup> .	Este trabajo
psul3	pUCYC5 con el gen <i>sul3</i> (incluyendo su S-D). CHL <sup>R</sup> y SMX <sup>R</sup> .	Este trabajo
pFolP-87 <sub>PW</sub>	pUCYC5 con el gen <i>folP</i> de la cepa de UPEC 87 <sub>PW</sub> . CHL <sup>R</sup>	de los Santos et al., 2021
pFolP-40-1 <sub>CH</sub>	pUCYC5 con el gen <i>folP</i> de la cepa de UPEC 40-1 <sub>PW</sub> . CHL <sup>R</sup>	de los Santos et al., 2021
pFolP-W3110	pUCYC5 con el gen <i>folP</i> de la cepa W3110. CHL <sup>R</sup>	de los Santos et al., 2021

Las cepas se cultivaron en medio nutritivo Luria-Bertani (LB) a 37°C. Para analizar la susceptibilidad a los antifolatos de las cepas de UPEC, estos fármacos se agregaron al medio LB en las siguientes concentraciones finales: TMP (200 µg/ml), SMX (800 µg/ml), y SXT (100 µg/ml TMP y 500 µg/ml SMX). Se prepararon las placas con los antifolatos según Poey et al., 2019. Para los experimentos con *E. coli* K12, los antibióticos fueron añadidos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina, AMP (100 µg/ml), cloranfenicol, CHL (60 µg/ml), kanamicina, KAN (30 µg/ml), ácido nalidíxico, NAL (40 µg/ml), y SMX (200, 300 y 500 µg/ml). Todos los antibióticos empleados fueron de marca Sigma.

Se utilizó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) a una concentración final de 20 µl/ml, como indicador cromogénico de la actividad β-galactosidasa para la detección de clones recombinantes en experimentos de clonado.

### III.2. Amplificaciones PCR

El relevamiento de los genes *sul1*, *sul2*, *sul3*, *sul4*, *intI1* y *qacEA*, así como del promotor *Pc* y la región variable se realizó mediante la técnica de PCR. Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 30 µl que contenía: 1X de buffer, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 200 nM de cada cebador, 2U de ADN polimerasa High Taq (Bioron) y 10 µl de lisado celular (por calor a 80°C por 30 minutos). Las condiciones utilizadas fueron: 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, la temperatura de hibridación durante 30 seg y 72°C entre 1 y 4 min (dependiendo del tamaño del fragmento), y una extensión final a 72°C por 2 min. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron a través de electroforesis en geles de agarosa de entre 0,8 y 2% que se tiñeron con bromuro de etidio y expusieron a radiación UV. Los cebadores usados, las temperaturas de hibridación, así como los tamaños de los fragmentos amplificados se presentan en la **Tabla 2**.

Las amplificaciones PCR para clonado de *sul1*, *sul2*, *sul3* y *folP* se realizaron empleando ADN molde extraído mediante los kits comerciales para ADN plasmídico y genómico, QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) y Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), respectivamente. Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 30 µl que contenía: 1X buffer, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 500 nM de cada cebador, 1,2U de ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Bioline) y 1 µl de ADN molde. Las condiciones utilizadas fueron: 30 seg a 98°C, seguido por 30 ciclos de 98°C por 10 seg, temperatura de hibridación por 30 seg y una extensión por 30 seg a 72°C, y una extensión final a 72°C por 5 min (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR**

Locus/Tamaño de producto (pb)	Nombre	Secuencia (5'-3')	Temp. de hibr. (°C)	Referencia
<b>Relevamiento</b>				
<i>sul1</i> (840)	sul1F	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTG	61	Poey & Laviña, 2018
	sul1R	CTAGGCATGATCTAACCCCTCGG		
<i>sul2</i> (727)	sul2F	TTTCGGCATCGTCAACATAA	54	Trobos et al., 2009
	sul2R	GTGTGTGCGGATGAAGTCAG		
<i>sul3</i> (223)	sul3F	GAAGTGGGCGTTGTGGAAGAAAT	61	Poey & Laviña, 2018
	sul3R	GAACGGAGTGCATCAACACAAGTT		
<i>int11</i> (473)	HS463a	CTGGATTTTCGATCACGGCACG	55	Chowdhury et al., 2011
	HS464	ACATGCGTGTAATCATCGTCCG		
Promotor <i>Pc</i>	Pre- <i>Pc</i>	GATGCGTGGAGACCGAAACCTT	62	Poey & Laviña, 2014
	Post- <i>Pc</i>	GCGACTGCCCTGCTGCGTAACAT		
Región variable	HS458	GTTTTGATGTTATGGAGCAGCAACG	55	Márquez et al., 2008
	HS459	GCAAAAAGGCAGCAATTATGAGCC		
<i>qacEA</i> (477)	EP4	CGTTAGATGCACTAAGCAC	53	de los Santos et al., 2021
	EP5	TTCAGAATGCCGAACACCGTC		
<i>folP</i> (1108)	folPF	TGGCGACAATGGTAGTCCAAA	62	de los Santos et al., 2021
	folPR	AAGCACAAAATCAGGTGTGATCGG		
<i>sul4</i> (349)	sul4F	GGAGATGGCGTTATGGTTGA	57	de los Santos et al., 2021
	sul4R	GGTTGTGCATAAGGACGATGG		
Vector pUCYC5	reverso	CACAGGAAACAGCTATGACC	ver <b>Fig. S1</b>	Miller et al., 1992
<b>Clonado de genes</b>				
<i>P-qacEA-sul1</i> (1291) para psul1L	EP4	ver arriba	55	
	sul1R	ver arriba		
<i>sul1</i> (873) para psul1S	SDsul1F	CCCATCGTGGAGTCGCT	55	Este trabajo
	sul1R	ver arriba		
<i>sul2</i> (877) para psul2	SDsul2F	TTTCGACCCGAGCATCCGTAT	58	Este trabajo
	FINsul2R	AGTTAACGAATTCTTGCGGTTTCT		
<i>sul3</i> (813) para psul3	SDsul3F	GTAATCAAAGCAAAATGATATGAG	59	Este trabajo
	FINsul3R	AACTAACCTAGGGCTTTGGATA		
<i>folP</i> (1108) para pFolP-87 <sub>PW</sub> , pFolP-40-1 <sub>CH</sub> y pFolP-W3110	folPF	ver arriba		
	folPR	ver arriba		

### III.3. Clonado de los genes *sul* y *folP*

En todos los casos los insertos fueron amplicones generados con la enzima Phusion, que produce extremos romos, y se clonaron en el sitio *SmaI* del vector pUCYC5 (ver **Anexo**), usando los cebadores presentados en la **Tabla 2**. La ligación se realizó directamente con la enzima Ligasa T4 (Biolabs). Los procedimientos del ADN recombinante empleados se realizaron según Sambrook et al., 1989.

Los ADN moldes para las amplicaciones fueron los siguientes: plásmido pINT11 para psul1L y psul1S, plásmido p27<sub>CH</sub> para psul2 y plásmido p73-2<sub>CH</sub> para psul3. Los plásmidos pFolP-87<sub>PW</sub>, pFolP-40-1<sub>CH</sub> y pFolP-W3110 se construyeron clonando el gen *folP* amplificado a partir de las cepas del mismo nombre (**Tabla 1**).

#### **III.4. Transformación de *E. coli* K12**

Los plásmidos recombinantes fueron introducidos por transformación en preparaciones de células competentes por el método químico con CaCl<sub>2</sub>, según Sambrook et al., 1989. Se hicieron cultivos de 50 ml de LB de cada cepa a transformar hasta una DO<sub>600</sub> entre 0,3 y 0,5. Las células se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min y se resuspendieron en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril, incubándolas en hielo por 20 min. Luego, se hizo una segunda centrifugación en las mismas condiciones y finalmente las bacterias se resuspendieron en 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 100 mM estéril manteniéndolas en hielo en la heladera. Las células competentes se pueden emplear para ser transformadas partir de las 24 h en frío hasta una semana después.

En la transformación, se mezclaron 100 µl de células competentes de *E. coli* K12 con el ADN plasmídico de interés, disuelto en un volumen no superior a 25 µl. Se dejó en hielo durante 10 min y, posteriormente, se pasó la mezcla a un baño a 37°C por 5 min (shock térmico); este cambio abrupto de temperatura permite el ingreso del ADN al interior de la célula. Luego se agregaron 2 ml de LB para realizar la expresión fenotípica a 37°C por 2 h. Se sembraron alícuotas de 200 µl en placa de LB con el antibiótico de selección de los transformantes correspondiente y se incubaron a 37°C por 18-24 h. El control del experimento (control bacteria), que consiste en células sin ADN, fue igualmente procesado.

#### **III.5. Conjugaciones entre estirpes de *E. coli* K12**

Las estirpes a conjugar se incubaron en medio líquido LB a 37°C hasta la fase logarítmica media (ca. DO<sub>600</sub> = 0,5). Es importante que la donante se cultive sin agitación para no romper los pili conjugativos. Posteriormente, ambos cultivos, de donante y receptora, se mezclaron en una proporción de volumen de 1:4. Las mezclas se incubaron estáticamente a 37°C durante 24 h. Paralelamente, se procedió de igual manera con cultivos de los controles de las estirpe donante y receptora, por separado. Se sembraron alícuotas de 50 µl de las mezclas de conjugación y de los controles en placas suplementadas con dos antibióticos, uno para la selección y otro para la contraselección, de modo que solo puedan crecer los transconjugantes deseados.

### **III.6. Secuenciación**

Los productos de PCR correspondientes a la región variable, el promotor *Pc* y el gen *qacEΔ* del *Int1* se secuenciaron en el servicio de Macrogen Inc (Seoul, Korea). El producto de PCR del gen *folP* fue secuenciado en la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo y se depositó las secuencias de ADN en el GenBank con los siguientes números de acceso: OK169292 para el *folP* de la cepa 87<sub>PW</sub> y OK169293 para el *folP* de la cepa 40-1<sub>CH</sub>.

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Susceptibilidad a los antifolatos

La colección de cepas de UPEC del laboratorio, que consta de 230 aislamientos, ya se había caracterizado para la susceptibilidad a diferentes antibióticos, entre ellos el SXT mediante disco-difusión. También se había analizado la susceptibilidad a TMP y SMX, por separado, de los 50 aislamientos Int1<sup>+</sup> de la colección [Poey et al., 2012; Poey & Laviña, 2018]. En esta tesis se completó la caracterización fenotípica de la susceptibilidad a TMP, SMX y SXT en la colección. Para ello, las cepas se sembraron por estría en medio sólido LB con los antibióticos incorporados y las placas se incubaron durante 24 horas [Poey et al., 2019]. Se consideró a las cepas resistentes cuando formaron una estría completa, es decir, con una zona de crecimiento confluyente y colonias aisladas de aprox. 1 mm de diámetro. La prevalencia de las resistencias en la colección de UPEC fue de 54% para SMX, de 46% para TMP y de 44% para SXT. Como era de esperar, las cepas resistentes a SXT lo fueron también a sus dos componentes por separado. La resistencia a estos dos compuestos coexistió en la mayoría de las cepas (N = 102). Tres cepas fueron resistentes sólo a TMP y 23 sólo a SMX (**Tabla 3**).

### IV.2. Relevamiento de genes *sul*

Como se indicó en la Introducción, la resistencia a SMX en la especie de *E. coli* generalmente está conferida por los genes móviles *sul1*, 2 y/o 3. Previamente, se había analizado su presencia en 45 cepas Int1<sup>+</sup> de la colección de UPEC [Poey & Laviña, 2018]. En el presente trabajo, se completó el relevamiento en el total de la colección. Juntando todos los resultados, anteriores y actuales, se encontró que: 57 cepas tenían *sul1*, 92 *sul2* y sólo una *sul3* (**Tabla 3**). La coexistencia de *sul1* y *sul2* fue bastante frecuente. Todas las cepas que tuvieron algún gen *sul* fueron resistentes a SMX. Sin embargo, hubo tres cepas resistentes a SMX, pero que carecieron de dichos genes: 40-1<sub>CH</sub> (Int1<sup>+</sup>), y 87<sub>PW</sub> y 35-1<sub>CH</sub> (Int1<sup>-</sup>). Es importante recordar que el contenido genético *sul* no determinó diferencias apreciables en el crecimiento cuando las cepas se analizaron en placas con SMX.

En términos generales, el gen *sul2*, solo o con *sul1*, fue el que predominó. Además, la mayoría de las cepas *sul2*<sup>+</sup> fueron negativas para el Int1, lo que señala una independencia de este gen con respecto al integrón. El gen *sul1* estuvo claramente asociado con el gen de la integrasa,

*intI1*, pero es importante destacar que 16 cepas *sulI*<sup>+</sup> carecieron de este, lo que indicaría que *sulI* podría existir en forma independiente de los Int1.

**Tabla 3. Resistencia a los antifolatos y presencia de los genes *sul* en las cepas de la colección de UPEC**

Cepas (número)	Fenotipo			Genotipo				
	SMX <sup>R</sup>	TMP <sup>R</sup>	SXT <sup>R</sup>	<i>sulI</i> <sup>+</sup>	<i>sulI</i> <sup>+</sup> <i>sul2</i> <sup>+</sup>	<i>sulI</i> <sup>+</sup> <i>sul3</i> <sup>+</sup>	<i>sul2</i> <sup>+</sup>	<i>sul</i> <sup>-</sup>
Int1 <sup>+</sup> (50) <sup>(a)</sup>	50	48	48	22	18	1	8	1
Int1 <sup>-</sup> (180)	75	57	54	7	9	0	57	107
<b>Total (230)</b>	125	105	102	29	27	1	65	108

(a) Presencia de Int1 por el criterio clásico de presentar el gen *intI1* [Poey & Laviña, 2018]

### IV.3. El gen *sulI* es un marcador del integrón de clase 1

Aunque el gen de la integrasa, *intI1*, es el marcador usado para detectar los Int1 mediante PCR, se puede pensar que otras regiones de la plataforma conservada de estos elementos pueden servir para este propósito, e.g. el promotor *Pc* o el gen *sulI*. Además, debemos considerar que los Int1 son parte del genoma flexible y pueden sufrir distintos reordenamientos, incluidas deleciones, de modo que la ausencia de un marcador no implicaría la ausencia del integrón entero. En este sentido, se buscó en las 16 cepas *sulI*<sup>+</sup> *intI1*<sup>-</sup> la presencia de otros determinantes del Int1. Se detectó que 14 de estas cepas contenían el promotor *Pc* y 15 la región variable. El aislamiento que careció de ambas regiones fue analizado para *qacEA*, obteniéndose amplificación (Tabla 4 y Fig. S2). En todos los casos se secuenciaron los amplicones y se comprobó su contenido genético. Dado estos resultados, podríamos decir que el gen *sulI* no existiría en forma independiente del Int1. Más aún, el gen *sulI* sería un buen marcador de la presencia del Int1 aumentando así el número de cepas Int1<sup>+</sup> de nuestra colección de 50 a 66, i.e. su prevalencia se incrementó de 22% a 29%.

**Tabla 4. Contenido genético de amplicones Int1 de las cepas UPEC *sulI*<sup>+</sup> y *intI1*<sup>-</sup>**

Cepas	43-2 <sub>CH</sub>	89-1 <sub>CH</sub>	73-1 <sub>CH</sub>	8 <sub>CH</sub>	14 <sub>CH</sub>	19 <sub>CH</sub>	26 <sub>CH</sub>	36-1 <sub>CH</sub>	36-2 <sub>CH</sub>	49-1 <sub>CH</sub>	68-1 <sub>CH</sub>	80-1 <sub>CH</sub>	85-1 <sub>CH</sub>	117 <sub>PW</sub>	33-4 <sub>CH</sub>	57-1 <sub>CH</sub>
Promotor <i>Pc</i>	<i>W-P2</i>	<i>W</i>	<i>W</i>	<i>H1</i>	-	-										
Región variable	<i>dfrA14</i> <i>aadA1</i>	<i>dfrA7</i>	<i>dfrA1</i> <i>aadA1</i>	<i>dfrA17</i> <i>aadA5</i>	-											
Región <i>qacEA</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<i>qacEA</i>

n.d., no determinado

#### IV.4. Cepas resistentes a sulfamidas que carecen de genes *sul*

Como se indicó previamente, hubo tres cepas SMX<sup>R</sup> (40-1<sub>CH</sub>, 87<sub>PW</sub> y 35-1<sub>CH</sub>) que carecieron de los genes *sul1*, 2 y 3. A dichas cepas se les analizó, por PCR, la presencia del gen *sul4*, obteniéndose un resultado negativo para todas ellas. Es así que se las consideró posibles mutantes del gen cromosómico *folP*. Éste se amplificó con la región intergénica que le precede, donde debería localizarse su promotor, tomando como referencia la secuencia de *E. coli* K12 W3110 (GenBank ac. no. AP009048). Los tres amplicones fueron secuenciados y se encontró que presentaban distintos alelos (**Fig. S3**).

La cepa 40-1<sub>CH</sub> era portadora de un Int1 con un *PcH1*, y con los genes *dfrA17* y *aadA5* en su región variable. Es la única cepa en la colección portadora de un Int1 que careció de todos los genes *sul*. Su gen *folP* tuvo dos mutaciones puntuales en su región codificante causantes de los cambios aminoacídicos I38L y S70C en la enzima.

Las otras dos cepas resistentes a SMX serían Int1<sup>-</sup>, ya que son *intI1* y *sul1* negativas. En la cepa 87<sub>PW</sub> el gen *folP* presentó una mutación que determinó el cambio aminoacídico P64S. Cabe mencionar que este alelo fue descrito previamente por otros autores indicando que confería niveles bajos de SMX<sup>R</sup> [Vedantam et al., 1998]. Por otro lado, el gen *folP* de la cepa 35-1<sub>CH</sub> mantuvo la misma secuencia que la cepa de referencia W3110, por lo que el motivo de su resistencia a SMX aún se desconoce.

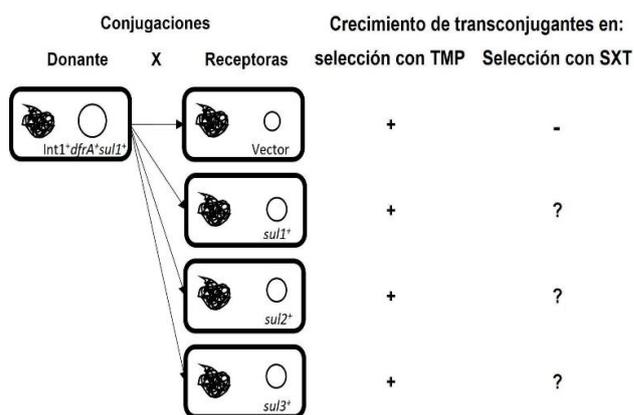
Con el objetivo de explicar el fenotipo de SMX<sup>R</sup> de la cepa 40-1<sub>CH</sub>, su locus *folP* se clonó y se introdujo en *E. coli* K12, como se indicó en Materiales y Métodos. Paralelamente, se procedió de igual manera con el locus de 87<sub>PW</sub> y de W3110. Los transformantes se seleccionaron con el antibiótico CHL y luego se analizaron para su susceptibilidad a SMX (300 µg/ml). Las estirpes portadoras de los alelos *folP* de 40-1<sub>CH</sub> y W3110 fueron igualmente sensibles. La que tenía el plásmido con *folP* de 87<sub>PW</sub> creció muy pobremente, con colonias pequeñas, de modo que este alelo explicaría en muy poca medida la resistencia de la cepa de UPEC 87<sub>PW</sub>. En cuanto a la secuencia de la proteína FolP de 40-1<sub>CH</sub>, se buscó en el banco de datos, encontrando que la misma está en varias decenas de cepas de *E. coli*.

En suma, la resistencia a SMX de las tres cepas estudiadas no puede ser asignada a mutaciones en el gen *folP*.

#### IV.5. Transferencia del integrón de clase 1 por conjugación

En experimentos anteriores realizados en nuestro laboratorio se introdujeron plásmidos Int1<sup>+</sup> portadores de distintos genes *sul* en células de *E. coli* K12. En este contexto surgieron dos observaciones relevantes que nos llamaron la atención. Primero, los distintos genes *sul* transferidos confirieron distintos niveles de resistencia a SMX [Poey & Laviña, 2018]. Segundo, la transferencia por conjugación del Int1 y su establecimiento en *E. coli* K12 dependió de los genes *sul* portados por el plásmido Int1<sup>+</sup>. Si el plásmido tenía *sul2* o *sul3*, solos o junto con *sul1*, crecieron transconjugantes en presencia de SMX. Por el contrario, cuando tenía sólo *sul1* no hubo crecimiento ninguno. Este resultado negativo no se debía a un defecto en la transferencia horizontal del plásmido sino a un impedimento en su establecimiento en la bacteria receptora bajo la presión del SMX. Esto se dedujo del hecho de que sí se obtuvieron transconjugantes del plásmido Int1<sup>+</sup> cuando se seleccionaron con otros antibióticos para los que el propio plásmido también confería resistencia. Curiosamente, estos transconjugantes, luego de hacer múltiples generaciones en un medio libre de SMX, sí crecieron y formaron estría en placas con este antibiótico, como en una especie de maduración fenotípica [Poey et al., 2019]. Este contraste tan marcado está en la base de los análisis que se presentan a continuación.

En este trabajo nos preguntamos qué influencia puede tener en la transferencia horizontal del Int1 la presencia de algún gen *sul*, pero ahora en la cepa receptora. Es decir, los genes *sul* ¿podrían generar un contexto permisivo para el establecimiento del Int1 en presencia de SMX? Vemos en el análisis de esta posibilidad el interés de dilucidar posibles rutas de diseminación de los Int1 bajo, por ejemplo, la presión selectiva de SMX o SXT en un tratamiento antibiótico. Para responder esta interrogante, se construyeron estirpes derivadas de *E. coli* K12 portadoras de los diferentes genes *sul*, para utilizarlas como receptoras en ensayos de conjugación de plásmidos con Int1 y *sul1*, como único gen *sul*. Por lo tanto, estas receptoras serán resistentes al SMX por contener algún gen *sul*. De esta manera, no se podrá emplear SMX para seleccionar los transconjugantes Int1<sup>+</sup>. Para superar este inconveniente, los plásmidos Int1 a utilizar no sólo conferirán resistencia a SMX, sino que también a TMP y, por ende, a SXT. Es así que la respuesta a nuestra interrogante podrá ser dilucidada a través de la comparación entre los resultados de las selecciones de los transconjugantes en TMP y en SXT (**Fig. 4**).



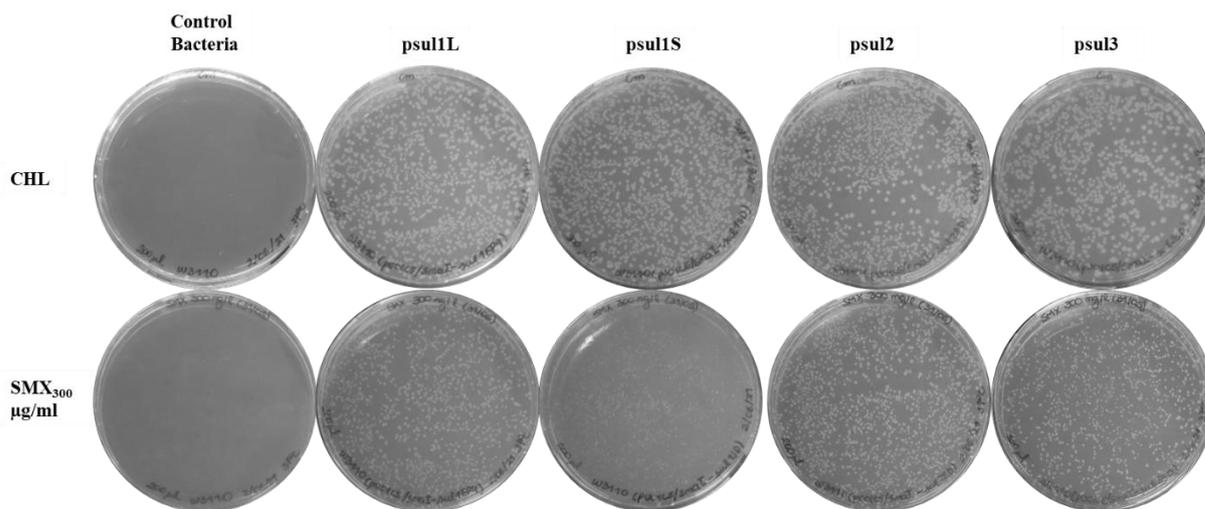
**Fig. 4. Estrategia general de experimentos de transferencia horizontal de plásmidos Int1<sup>+</sup> para determinar la influencia de los genes *sul* en la receptora.** De izquierda a derecha se representan: las características de las estirpes donantes de *E. coli* K12, portadoras de un plásmido Int1<sup>+</sup>sul1<sup>+</sup>dfrA<sup>+</sup> (SXT<sup>R</sup>); las características de las estirpes de *E. coli* K12 receptoras, portadoras de plásmido recombinante con diferentes genes *sul* o con el pUCYC5, y el crecimiento de los transconjugantes Int1<sup>+</sup> según la selección empleada.

#### IV.5.1. Construcción de estirpes de *E. coli* K12 con plásmidos recombinantes portadores de genes *sul*

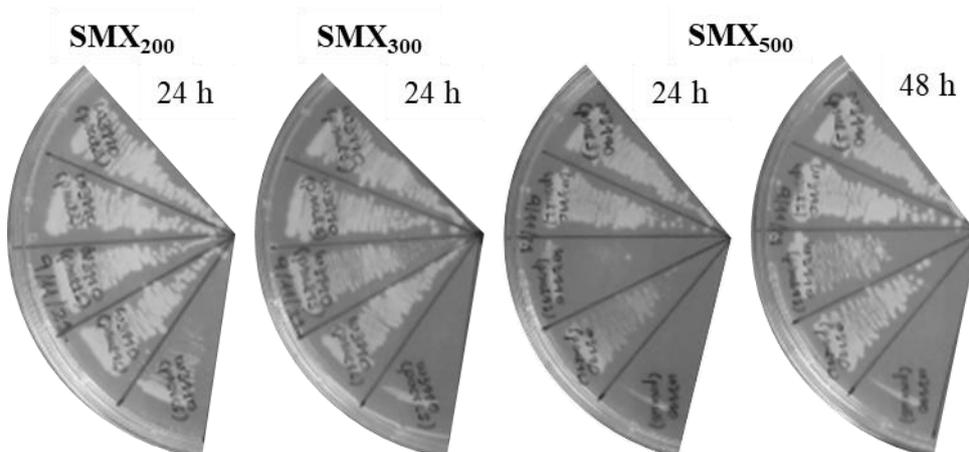
Para la construcción de estas estirpes se clonaron amplicones que contenían los genes *sul1*, 2 y 3 en el vector plasmídico pUCYC5 y se transformaron células competentes de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$ , como se indica en Materiales y Métodos. Los clones transformantes se seleccionaron en placas con CHL. Los plásmidos recombinantes fueron psul1L (4201 pb), psul1S (3783 pb), psul2 (3787 pb) y psul3 (3723 pb) (Tabla 1 y Fig. 5). En todos los casos se conservó la secuencia Shine-Dalgarno de cada gen y en psul1L también se incluyeron más secuencias “upstream”, con el clonado del operón *qacEA-sul1* completo.

Luego de purificar los transformantes en el mismo medio en que fueron seleccionados, se procedió a estudiar la direccionalidad de los fragmentos clonados. Para psul1L y psul1S, la dirección del inserto se determinó por restricción con la enzima EcoRV. En el caso de psul1L se esperaban las bandas de 2122 pb y de 2079 pb (por su tamaño semejante se ven como banda única) si el operón estaba bajo el influjo de *POlac*, y si no lo estaba, se esperaban dos bandas de 1899 y de 2302 pb. Para psul1S, si el gen *sul1* estuviese bajo el influjo de *POlac* se esperaban las bandas de 1704 y 2079 pb y, en caso contrario, las bandas de 1884 y 1899 pb (no se separan por su tamaño) (Fig. 5). La direccionalidad de los fragmentos clonados presentes en psul2 y psul3 de 6-8 clones de cada tipo se detectó mediante PCR con diferentes combinaciones de cebadores que hibridaban por un lado con el fragmento clonado y, por el otro, con el vector (Tabla 2 y Fig. S1). En suma, la direccionalidad de los fragmentos obtenidos fue la siguiente: para psul1L y psul3, se obtuvieron clones con fragmentos a favor y en contra del *POlac*; para psul1S y psul2 se obtuvo fragmentos clonados únicamente bajo el influjo del *POlac*. Se continuó trabajando con un clon portador de cada plásmido recombinante donde la expresión génica en el inserto quedaba bajo el influjo del *POlac* (Fig. 5).





**Fig. 6.** Transformaciones de *E. coli* K12 W3110 con *psul1L*, *psul1S*, *psul2* y *psul3*. Placas de selección de los transformantes. A la izquierda se indica el antibiótico empleado para la selección.



**Fig. 7.** Niveles de resistencia a SMX conferidos por los plásmidos recombinantes portadores de los genes *sul* en contexto *E. coli* K12 W3110. En todas las placas, el orden desde arriba hacia abajo es: *psul3*, *psul2*, *psul1S*, *psul1L* y el control con el vector pUCYC5.

#### IV.5.2. Conjugación del integrón de clase 1 desde *E. coli* K12 Int1<sup>+</sup> a *E. coli* K12 con plásmidos recombinantes portadores de genes *sul*

Como se indicó en la sección previa, una vez obtenidas las células de W3110 portadoras de los plásmidos recombinantes con distintos genes *sul*, se procedió a emplearlas como receptoras en experimentos de conjugación. Como donantes, se usaron dos estirpes de *E. coli* K12 BZB1011  $\Delta$ *hsdR::kan* portadoras de plásmidos naturales Int1<sup>+</sup> *sul1*<sup>+</sup> *dfrA*<sup>+</sup>. Estos plásmidos se denominaban p10<sub>CH</sub> y p48-1<sub>CH</sub> y procedían de cepas de UPEC del mismo nombre (**Tabla 1**). Los mismos se habían transferido por conjugación desde las correspondientes UPEC a *E. coli*

K12 BZB1011 *AhsdR::kan*, por lo que evidentemente eran conjugativos [Poey & Laviña, 2018].

Las conjugaciones se realizaron según se explicó en Materiales y Métodos. Dependiendo de las resistencias codificadas por los plásmidos Int1<sup>+</sup> se emplearon los siguientes medios de selección: para p10<sub>CH</sub>, AMP, TMP y SXT, y para p48-1<sub>CH</sub>, TMP y SXT. Además, se usó como receptora control W3110 con el plásmido vector pUCYC5, carentes de genes *sul*, incluyéndose en este caso la selección en SMX. En todas las conjugaciones se utilizó el CHL como antibiótico de contraselección.

Los resultados obtenidos indicaron que los plásmidos p10<sub>CH</sub> y p48-1<sub>CH</sub>, y por ende el Int1, pudieron transferirse desde ambas donantes a todas las receptoras (**Tabla 5**). En el caso de la donante con p10<sub>CH</sub>, se obtuvieron transconjugantes en el orden de 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> ufc/ml empleando cualquiera de las cinco receptoras, en las selecciones con AMP o con TMP. Se observó, además, que el número de clones crecidos fue mayor cuando la receptora contenía algún gen *sul* que cuando no tenía ninguno (**Tabla 5** y **Fig. 8**). Cuando se empleó la cepa donante de p48-1<sub>CH</sub>, también hubo transconjugantes con todas las receptoras en la selección con TMP, aunque en bajo número (**Tabla 5** y **Fig. S4**). En suma, para estas selecciones se confirmaron las previsiones según nuestra estrategia: hubo transconjugantes, pero, inesperadamente, estos fueron más abundantes con las receptoras *sul*<sup>+</sup> (ver **Fig. 4**).

En lo referente a nuestras interrogantes sobre el crecimiento o no de los transconjugantes en placas con SXT, los resultados fueron claramente informativos. En el caso de la transferencia del plásmido p10<sub>CH</sub>, a las 24 h crecieron colonias con las receptoras que portaban los genes *sul2* o *sul3* en un número similar al obtenido con las otras selecciones (10<sup>4</sup> ufc/ml). Las placas con SXT sin crecimiento se siguieron incubando hasta 96 h. A las 48 h aparecieron abundantes clones transconjugantes SXT<sup>R</sup> (en el orden de 10<sup>4</sup> ufc/ml), usando la receptora que contenía *psul1L*. En los demás cruzamientos, con el pUCYC5 y con *psul1S*, nunca crecieron clones (**Tablas 5** y **Fig. 8**).

En las conjugaciones con el plásmido p48-1<sub>CH</sub>, los resultados fueron esencialmente coherentes con los obtenidos con p10<sub>CH</sub>, pero el número de clones transconjugantes fue muy bajo. En el caso de la selección con TMP el número de clones fue contable mientras que en la selección con SXT no hubo crecimiento, por lo que se sembró un volumen de mezcla de conjugación cinco veces mayor para poder detectar colonias en ese medio. En la **Tabla 5** se muestran los resultados de la siembra X1 en la selección con TMP y X5 con SXT (**Fig. S4**). Hubo una diferencia adicional con la conjugación de p10<sub>CH</sub>: los clones transconjugantes SXT<sup>R</sup> en el

contexto receptor con *sul3* no crecieron hasta las 48 h y fueron 10 veces más escasos que los seleccionados con TMP (**Tabla 5** y **Fig. S4**).

Por lo tanto, en presencia de SXT el contexto receptor portador de *sul2* demostró ser el más permisivo para el establecimiento del *Int1*, desde ambas estirpes donantes, obteniéndose transconjugantes a las 24 h. Por otro lado, el contexto con *psul1S* se comportó igual que el que presentaba sólo *pUCYC5*, siendo ambos refractarios al establecimiento del integrón. Este resultado, al compararse con el obtenido con el *psul1L*, revelaría la importancia del operón *P-qacEA-sul1* (*P*, promotor).

**Tabla 5. Número de transconjugantes (ufc/ml) en los cruzamientos con transferencia de plásmidos *Int1*<sup>+</sup> según el contexto *sul* de la receptora y la presión antibiótica de selección**

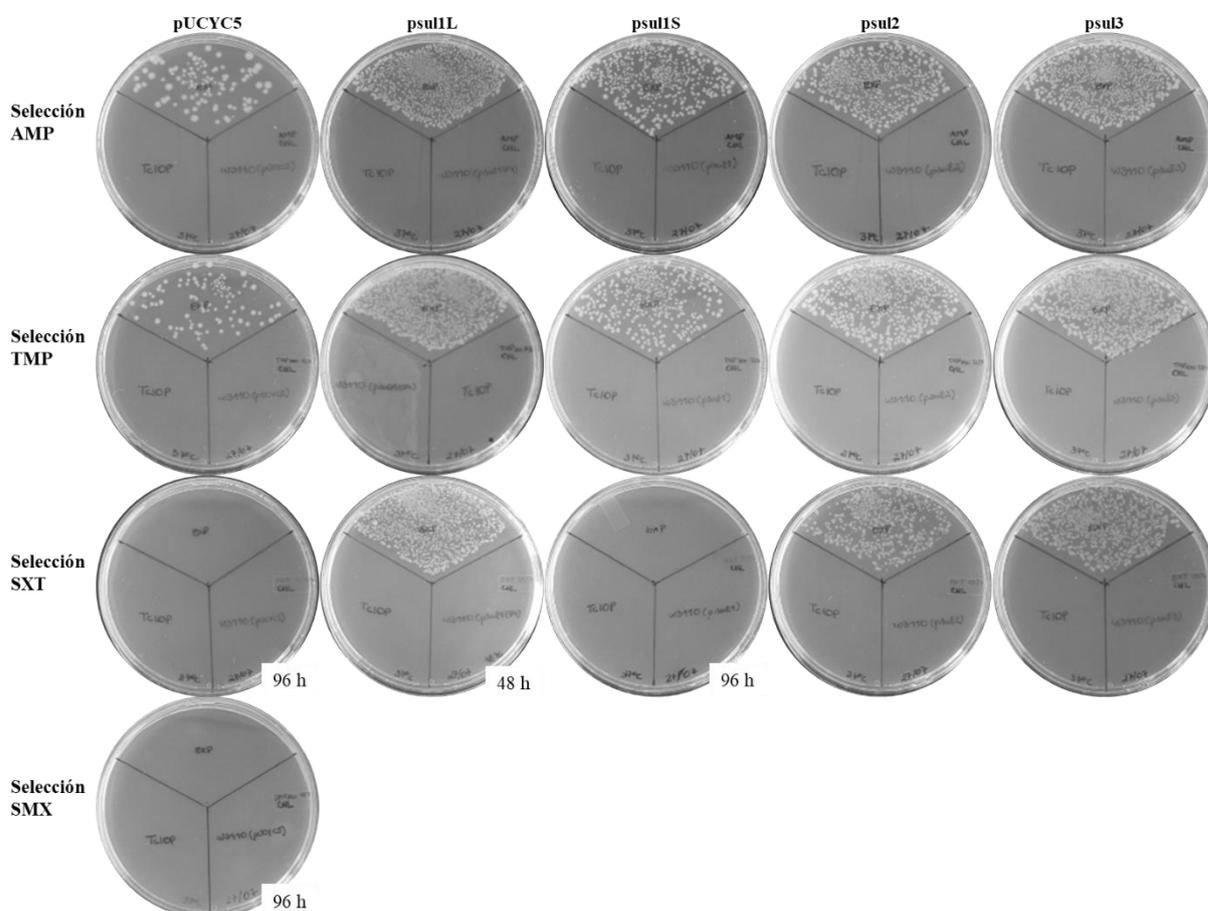
Donantes <i>E. coli</i> K12	Receptoras <i>E. coli</i> K12	Presiones selectivas empleadas			
		AMP CHL	TMP CHL	SXT CHL <sup>(a)</sup>	SMX <sub>300</sub> CHL
BZB1011	W3110 ( <b>pUCYC5</b> )	2,3X10 <sup>3</sup>	2,1X10 <sup>3</sup>	0	0
<i>ΔhsdR:kan</i> ( <b>p10<sub>CH</sub></b> )	W3110 ( <b>psul1L</b> )	2,8X10 <sup>4</sup>	3,4X10 <sup>4</sup>	3,3X10 <sup>4</sup> (48 h)	n.c.
	W3110 ( <b>psul1S</b> )	1,1X10 <sup>4</sup>	8,8X10 <sup>3</sup>	0	n.c.
	W3110 ( <b>psul2</b> )	1,8X10 <sup>4</sup>	1,5X10 <sup>4</sup>	1,3X10 <sup>4</sup>	n.c.
	W3110 ( <b>psul3</b> )	2,2X10 <sup>4</sup>	2,0X10 <sup>4</sup>	1,4X10 <sup>4</sup>	n.c.
	BZB1011	W3110 ( <b>pUCYC5</b> )	n.c.	1,4X10 <sup>2</sup>	0
<i>ΔhsdR:kan</i> ( <b>p48-1<sub>CH</sub></b> )	W3110 ( <b>psul1L</b> )	n.c.	1,0X10 <sup>2</sup>	8,0X10 <sup>1</sup> (48 h)	n.c.
	W3110 ( <b>psul1S</b> )	n.c.	4,0X10 <sup>1</sup>	0	n.c.
	W3110 ( <b>psul2</b> )	n.c.	1,6X10 <sup>2</sup>	1,2X10 <sup>2</sup>	n.c.
	W3110 ( <b>psul3</b> )	n.c.	8,0X10 <sup>1</sup>	8,0X10 <sup>0</sup> (48 h)	n.c.

(a)En las conjugaciones que involucran el plásmido *p48-1<sub>CH</sub>* el número de transconjugantes en medio con SXT CHL se calculó a partir de la siembra de un volumen de 250  $\mu$ l (5X) en relación al resto. n.c., no corresponde.

Se purificaron, en el mismo medio de selección, algunos clones transconjugantes de cada experimento de conjugación y de cada selección. Con el fin de comprobar su condición de transconjugantes del *Int1*, se analizó su susceptibilidad al antibiótico KAN y se amplificaron los genes de la integrasa (*intI1*) y de *sul1*. Se comprobó así que eran verdaderos transconjugantes KAN<sup>S</sup>, *intI1*<sup>+</sup> *sul1*<sup>+</sup>. También se realizaron los análisis cruzados de las resistencias antibióticas y se comprobó que todas ellas habían sido transferidas en bloque.

En suma, el establecimiento del *Int1* en *E. coli* K12, empleando como selección placas con SXT, se vio influenciado por los genes *sul* portados por la receptora. Es así que la presencia de *sul2* en la célula receptora mostró ser el contexto más permisivo para la rápida instalación del

Int1. Por su parte, la presencia del operón *P-qacEA-sulI* (*psul1L*) resultó igualmente permisiva, pero los clones transconjugantes tardaron un día más en crecer.



**Fig. 8. Experimentos de conjugación.** *E. coli* K12 BZB1011  $\Delta$ *hsdR::kan* (p10<sub>CH</sub>) X *E. coli* K12 W3110 (con pUCYC5 o con los plásmidos recombinantes). Las placas están divididas en tercios para sembrar en cada una de ella 50  $\mu$ l de control donante, control receptora y experimental. En la placa con la receptora portadora del plásmido *psul1L* se obtuvieron colonias a las 48 h de incubación en la selección SXT.

## V. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la vinculación entre los integrones de clase 1 y la resistencia a los antibióticos antifólicos, teniendo en cuenta su vinculación con la síntesis del ácido fólico. En este contexto, también se analizó la diseminación horizontal de los Int1 en la especie *E. coli*. Para ello se estudió una colección de cepas de UPEC recolectada de pacientes con infecciones en el tracto urinario de un hospital de Montevideo. Las mismas se obtuvieron durante un determinado período siguiendo un criterio de inclusión, por lo que los resultados son representativos de la realidad epidemiológica de ese tiempo y lugar y, probablemente, tengan una significación más amplia. Cabe mencionar que la colección había sido previamente estudiada desde varios puntos de vista, como la presencia de integrones clínicos, hecho que facilita la contextualización de nuevos resultados [Poey et al. 2012; Poey & Laviña, 2014; Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019].

En investigaciones previas, se puso a punto una metodología de análisis de la susceptibilidad a SMX, TMP y SXT mediante estrías en medio sólido con los antibióticos incorporados [Poey et al., 2019]. Los resultados actuales de resistencia a SXT por este nuevo método coincidieron con los obtenidos previamente por disco-difusión y, como era de esperar, las cepas resistentes al mismo también lo fueron a sus componentes por separado. La prevalencia de la resistencia a los antifolatos en la colección de cepas de UPEC fue relativamente semejante: 54% a SMX, 46% a TMP y 44% a SXT. Esta nueva forma de analizar la susceptibilidad a los antifolatos permitió detectar 23 cepas sólo resistentes a SMX y tres sólo a TMP. Sin embargo, estas resistencias coexistieron en la mayor parte de los casos (102 cepas). Tasas tan altas de resistencia conjunta parecen vincularse al extendido uso del SXT en la clínica, en particular para el tratamiento de infecciones urinarias [World Health Organization, 2021b].

Viendo la estructura del Int1 podemos inferir que existe una estrecha vinculación entre este elemento genético y la vía de síntesis del ácido fólico. Cabe recordar que los Int1 tendrían una gran plasticidad genética para la adquisición de distintos casetes génicos, pero los relevamientos realizados hasta ahora a nivel mundial indican una importante monotonía en su estructura: presentan en su plataforma conservada el gen *sulI*, que codifica para una dihidropteroato sintasa resistente a sulfamidas, y en su región variable, con una muy alta frecuencia, contienen un gen *dfrA*, que codifica para una dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprim [Domingues et al., 2015; Poey & Laviña, 2018]. Dadas estas observaciones, podríamos decir que los Int1 estarían particularmente dedicados a restaurar la vía Fol en presencia de sus inhibidores. Sin embargo,

se les atribuye una gran responsabilidad en la generación de multirresistencia [Leverstein-van Hall et al., 2003; Mathai et al., 2004]. Esto parece deberse, más que al contenido genético del integrón, a otros genes de resistencia que suelen estar ligados al mismo, formando verdaderos loci de multirresistencia [Poey & Laviña, 2018; nuestras observaciones no publicadas].

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se analizó la genética de la susceptibilidad a SMX en las cepas de la colección de UPEC. Como era de esperar, en su mayoría las cepas Int1<sup>+</sup> contenían el gen *sul1* solo o acompañado de *sul2* o *sul3*, y también pudieron tener únicamente el gen *sul2*. Esta observación ya había sido señalada por nuestro grupo y por otros autores [Antunes et al., 2005; Poey & Laviña, 2018]. En cuanto al gen *sul1*, es bien sabido que es un constituyente de la plataforma conservada de estos integrones, pero se desconocía si también podía existir independientemente de estas estructuras. En este trabajo se demuestra que el gen *sul1* siempre estuvo acompañado de otras secuencias de un Int1, ya estuviese éste completo o no. Consideramos entonces que *sul1* es un marcador de la presencia del Int1, al igual que el clásico marcador *intI1*. De todas formas, hay que señalar que la metodología empleada para detectar las distintas porciones del Int1 no asegura que estos loci estén genéticamente ligados en una única estructura, pero sí confirma su coexistencia en la misma célula. Por tanto, proponemos que, para detectar integrones en aislamientos de muestras naturales, es conveniente analizar tanto *intI1* como *sul1*, como marcadores de las dos porciones de la plataforma conservada, 5' y 3', para tener una mejor aproximación a la presencia real de estos elementos genéticos. Con este nuevo criterio, la prevalencia del Int1 en nuestra colección aumentó sustancialmente del 22 al 29%: la mayoría de nuestras cepas contenían ambos marcadores (41), 9 sólo *intI1* y 16 sólo *sul1* [de los Santos et al., 2021]. Estudios *in silico* llevados a cabo por otros autores también apuntan en esta dirección. Para generar una base de datos de Int1 a partir del “*whole genome database*” del NCBI, se propuso identificar estos integrones por la presencia de al menos dos de los siguientes tres elementos: el gen *intI1*, el sitio de recombinación de los casetes (*att*) y el gen *sul1*, siempre que estuvieran dentro de un segmento  $\leq 4$  kb [Zhang et al., 2018].

En cuanto a *sul2*, éste fue el gen *sul* más abundante en la colección de cepas UPEC. Estuvo presente en el 53% de las cepas Int1<sup>+</sup> y en el 35% de las carentes de Int1. En principio, aunque muy vinculado a la vía Fol en la que refuerza la primera etapa enzimática, *sul2* parece ser independiente de los Int1 [de los Santos et al., 2021].

Además, se encontraron tres cepas resistentes a SMX que carecían de genes *sul* (incluido el gen *sul4*). Una de ellas contenía un Int1. Dado que la resistencia a SMX podía deberse a mutaciones en el gen cromosomal *folP*, para la dihidropteroato sintasa, éste se procedió a secuenciar. Las

tres cepas tuvieron alelos diferentes; sin embargo, al clonarlos ninguno de ellos confirió los altos niveles de resistencia a SMX exhibidos por las cepas UPEC originales. Por tanto, concluimos que debe haber al menos un nuevo locus en *E. coli*, aún desconocido, que sea responsable de la resistencia total de estas cepas a SMX [de los Santos et al., 2021]. En este sentido, se han encontrado nuevos mecanismos de resistencia a las sulfamidas en algunas cepas bacterianas ambientales o en comunidades complejas, que consisten en modificar el antibiótico o incluso mineralizarlo. Dichos mecanismos no se han encontrado en cepas clínicas y no parecen generar altos niveles de resistencia a los antibióticos [Nunes et al., 2020]. Por lo tanto, parece bastante improbable que estas tres cepas de UPEC resistentes a SMX puedan poseer una de estas vías metabólicas. Aunque este punto queda por dilucidar, el hecho de que la única cepa Int1<sup>+</sup> desprovista de todo gen *sul* también fuera altamente resistente a SMX parece ser significativo. En suma, todas las cepas con Int1 fueron resistentes a SMX, independientemente de las bases genéticas de esta resistencia. Estos resultados sugieren que, por algún motivo, habría una especie de relación obligatoria entre los Int1 y la resistencia a SMX. Este vínculo Int1-SMX<sup>R</sup>, ¿será producto de la presión ejercida por dicho antibiótico en el medio o estará evidenciando una necesidad metabólica que detectamos a través de esta resistencia?

Es sabido que la distribución de los Int1 en el árbol bacteriano está acotada a ciertos grupos filogenéticos. Es así que están prácticamente ausentes en bacterias Gram-positivas y que incluso dentro de las Gram-negativas sólo se distribuyen en cepas de unas pocas familias [Zhang et al., 2018]. Además, en investigaciones previas de nuestro laboratorio, se encontró que dentro de la especie *E. coli* también existirían contextos más permisivos y otros menos propicios para el establecimiento de los Int1 [Poey & Laviña, 2014]. Este hecho resulta muy llamativo ya que los Int1 con frecuencia se encuentran en plásmidos conjugativos, algunos de amplio espectro de hospedero capaces de transgredir muchas barreras taxonómicas en eventos de transferencia horizontal [Redondo-Salvo et al., 2020]. En este sentido, se ha sugerido que existen factores que limitan su diseminación horizontal, aunque su naturaleza es mayormente desconocida. En nuestros trabajos previos se había observado la importancia del tipo de gen/es *sul* portado/s por el plásmido Int1 para su transferencia en presencia de SMX [Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019]. En esta tesis se encontró que estos mismos genes también son relevantes para la transferencia cuando se localizan en las células receptoras.

En los experimentos de conjugación, los dos plásmidos Int1<sup>+</sup> (*sul*<sup>+</sup> *dfrA*<sup>+</sup>) utilizados fueron capaces de transferirse a todas las receptoras, independientemente del gen *sul* que éstas contuvieran, en medios carentes de SMX. Por el contrario, en presencia de SMX (incluido en la selección con SXT), los transconjugantes no crecieron cuando las receptoras no tenían ningún

*sul* (solo con vector pUCYC5) o tenían *sul1* clonado en forma ajustada (psul1S). Anteriormente, se había observado que la co-transferencia del Int1 con *sul2* o *sul3* (probablemente por estar contenidos en el mismo plásmido) favorecía la instalación del integrón [Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019]. Nuestros resultados actuales también indican que la presencia de *sul2* en la receptora genera un ambiente permisivo para el establecimiento del Int1. La novedad es que la presencia de psul1L (operón *P-qacEA-sul1*) en la receptora permitió el establecimiento del Int1 en SXT, aunque los clones tardaron 48 h en crecer. Por un lado, esto podría explicarse porque el gen *sul1* se encuentra en una dosis génica elevada, al igual que en experimentos previos de transformación con un Int1 clonado [Poey et al., 2019]. Sin embargo, esto último no se cumplió para el plásmido psul1S. La diferencia entre estos dos plásmidos es que en psul1S, *sul1* carece de su promotor y del gen que le precede, *qacEA*, siendo expresado en forma artificial a partir del promotor *POlac*. Este resultado apunta en la dirección de que el operón *P-qacEA-sul1* sería una unidad funcional importante para el establecimiento del Int1 recién transferido. Como se mencionó más arriba, tener un gen *sul1* en la célula implica tener un Int1 o restos del mismo; por ende, la presencia de un Int1 en la cepa receptora podría aumentar la posibilidad de recibir otro. En este sentido, hemos observado en los bancos de datos que con frecuencia los genomas de cepas de *E. coli* portan más de una copia de Int1 y, muchas veces, con una o varias de éstas delecionadas.

Hasta aquí se han discutido los aspectos compartidos en los resultados de los experimentos con ambos plásmidos donantes, p10<sub>CH</sub> y p48-1<sub>CH</sub>. Sin embargo, estos plásmidos tienen diferencias entre sí que podrían explicar los resultados dispares en los experimentos de transferencia. El plásmido p10<sub>CH</sub> tiene dos replicones, FIB y FII, que son muy usuales en la especie *E. coli*, y su Int1 tiene una estructura muy frecuente, con los genes *dfrA17* y *aadA5* en su región variable. Por otro lado, p48-1<sub>CH</sub> es claramente singular: tiene el replicón L/M, típico de plásmidos de amplio rango de hospedero, con un Int1 de contenido inusual en su región variable, *dfrA15b*, *cmIA1* y *aadA2*. Ambas características fueron únicas en la colección estudiada [Poey & Laviña, 2018]. En los experimentos de conjugación la diferencia más grande fue en el número de transconjugantes: alto para p10<sub>CH</sub> y muy bajo para p48-1<sub>CH</sub>. Por este motivo nos centraremos en los resultados obtenidos con p10<sub>CH</sub>. Se constató que, en los ambientes permisivos para su transferencia, i.e. bajo las presiones con AMP o TMP, el número de transconjugantes crecidos con la receptora *sul<sup>-</sup>* fue mucho menor al obtenido con las receptoras *sul<sup>+</sup>*, en torno a un orden de magnitud menos (**Tabla 5** y **Fig. 8**). Surge entonces la pregunta: ¿por qué la mayor parte de estos transconjugantes Int1<sup>+</sup> no pudieron crecer en estos medios “permisivos”? Se podría deducir que encontraron limitaciones para crecer, la mayor parte fueron inviables y,

seguramente, terminaron muriendo. Si así fuera, el *Int1* sería en sí mismo perjudicial para las bacterias en las que ingresa; ese efecto sería aliviado por los genes *sul* en el plásmido transferido o en la bacteria receptora, y sería potenciado por la presencia de sulfamidas. De todas formas, esto no se observó con el otro plásmido, p48-1<sub>CH</sub>, y sin duda este aspecto merece ser más estudiado, a través de la transferencia de otros plásmidos *Int1*<sup>+</sup>.

Por otro lado, el gen *sul2*, no ligado al integrón, se destaca como facilitador de su transferencia, ya sea que se localice en el plásmido donado o en la cepa receptora. Si bien el rendimiento en transconjugantes fue algo menor en comparación con el obtenido con *psul1L*, los clones se evidenciaron siempre después de 24 h de incubación. En nuestra colección *Int1*<sup>+</sup>, más de la mitad de las cepas presentaron el gen *sul2*. Además, en nuestras observaciones preliminares en los bancos de datos se constata que la distribución de *sul2* en el árbol bacteriano es en todo semejante a la de los *Int1*. Indudablemente, el *Int1* y *sul2* participan de la vía *Fol* y, por lo tanto, están vinculados funcionalmente. Este aspecto nos resulta interesante para continuar nuestras investigaciones.

La estricta relación entre los *Int1* y el fenotipo de resistencia a SMX que hemos detectado es muy llamativa, más aún en vista de que esta vinculación parece ser independiente de la base genética de dicha resistencia. Además, la mayoría de las cepas *Int1*<sup>+</sup> fueron también resistentes a TMP, es decir, tendrían la vía *Fol* reforzada en dos de sus pasos enzimáticos. Considerando que tanto el SMX como el TMP no son antibióticos naturales sino productos sintéticos, éstos no habrían podido ejercer una presión selectiva para la formación y evolución de los integrones en la era pre-antibiótica. Dichas resistencias serían indicadoras de capacidades metabólicas específicas que han existido en las bacterias antes del uso clínico de estos antibióticos, cuyos determinantes genéticos fueron capturados por los integrones. Esta visión es apoyada por los resultados de otros autores. Se ha propuesto que los genes *sul* derivan de genes *folP* mutados, procedentes de miembros de las familias *Leptospiraceae* y *Rhodobiaceae*, que fueron movilizados y transferidos a través de muchos hospederos bacterianos hasta alcanzar su ubicación actual como genes móviles en cepas clínicas. Más aún, sugieren que este movimiento temprano de los genes *folP* mutados explicaría la fuerte asociación de *sul1* con los integrones de clase 1 [Sánchez-Osuna et al., 2019]. Esta hipótesis del surgimiento de los genes *sul* indicaría que confieren alguna ventaja selectiva más allá de su protección contra las sulfamidas. Por otro lado, recientemente se ha postulado, mediante análisis *in silico* e *in vitro*, que la resistencia a TMP también surgió antes del uso clínico de este fármaco. Habría surgido por un proceso similar al que dio origen a los genes *sul*, pero en este caso de captación de un gen *folA* [Sánchez-Osuna et al., 2020].

Existe un acuerdo general en que el uso de antibióticos en la clínica es el principal determinante para la propagación de las resistencias. Sin embargo, estudios filogenéticos de diversos genes de resistencia antibiótica sugieren que tienen una larga historia evolutiva que comenzó mucho antes de la era de la antibioterapia: se habrían originado en comunidades bacterianas ambientales para luego transferirse horizontalmente, alcanzando así a sus hospederos actuales [Aminov & Mackie, 2007]. Estos resultados se ven apoyados por los descubrimientos de Bhullar y colaboradores, quienes encontraron bacterias resistentes a la mayoría de los antibióticos naturales, semisintéticos y sintéticos en una cueva aislada por más de 4 millones de años [Bhullar et al., 2012]. Quizás muchas de las resistencias antibióticas se han mantenido en la naturaleza debido a que cumplen otras funciones, no relacionadas con los antibióticos, no dilucidadas aún. Estas funciones deben conferir a la bacteria ciertas ventajas, permitiendo así el mantenimiento y la diseminación de los genes de resistencia. Sin duda, el entendimiento de cuáles son esas otras funciones, sus orígenes, diseminación y ventajas metabólicas, proveerá pistas para comprender y controlar las resistencias antibióticas.

## VI. CONCLUSIONES

De este trabajo se pudo concluir que existe una vinculación estrecha entre los integrones de clase 1 y la resistencia a sulfametoxazol: todas las cepas de la colección de *E. coli* uropatógeno Int1<sup>+</sup> fueron SMX<sup>R</sup>. Es más, parecería que este fenotipo sea un requisito para la presencia del Int1 en una bacteria. Es así que, si bien el gen *sulI* forma parte de la plataforma conservada del Int1, no habiéndose encontrado por fuera de ésta, en aquellos casos donde esta plataforma se encontró deletada el contexto celular siempre aseguró un fenotipo de resistencia a sulfamidas, independientemente de su base genética. Desde un punto de vista operativo, se propone que, al igual que el gen para la integrasa *intI1*, *sulI* sea también un marcador válido de la presencia del Int1, siendo ambos testigos de la presencia de las regiones 5' y 3', respectivamente.

Por otro lado, se observó que la transferencia horizontal de los Int1 puede ser perjudicial y comprometer la viabilidad de la bacteria receptora, un fenómeno que se ve potenciado en presencia de sulfamidas en el medio. Por el contrario, la presencia de genes *sul* contrarrestó este efecto negativo, favoreciendo el establecimiento del Int1 en una nueva célula hospedera. Esto parece apuntar a posibles rutas de diseminación de los Int1 en *E. coli*, donde la presencia de *sul2* y/o de la porción 3' del Int1, i.e. *P-qacEA-sulI*, crearían condiciones más propicias para el establecimiento del Int1. En un sentido más amplio, nuestros resultados podrían contribuir a entender por qué los Int1 se distribuyen en unos pocos taxones bacterianos, lo que indica que su transferencia horizontal encuentra rutas permisivas en unas bacterias y restrictivas en otras. Considerando la dependencia Int1-SMX<sup>R</sup> y que la mayor parte de estos elementos contiene genes de resistencia a TMP, se deduce que los Int1 están fuertemente vinculados a la vía de síntesis del ácido fólico, codificando para enzimas que la refuerzan en sus etapas enzimáticas primera y última. Cabe preguntarse si ésta es la función que dio origen a los integrones de clase 1, siendo la base de su éxito y diseminación. Tal vez la resistencia a los antifolatos ha sido originalmente un fenómeno casual por el tipo de genes *fol* incorporado, pero luego se convirtió en una gran ventaja selectiva con el advenimiento de la antibioterapia.

## VII. PERSPECTIVAS

1. Realizar conjugaciones con otras cepas de *E. coli* K12 portadoras de plásmidos con *Int1*, *sul1*, como único gen *sul*, y un gen *dfrA*, con las mismas estirpes receptoras empleadas en los ensayos de este trabajo. Además, se añadiría una receptora con *folP* clonado. Este abordaje se realizaría con el fin de corroborar que la diseminación horizontal de los integrones depende del contexto *sul* de la cepa receptora o simplemente de que la primera etapa enzimática de la vía esté reforzada. Para ello se buscarán cepas de UPEC que transfieran plásmidos *Int1* a *E. coli* K12 y que cumplan con las condiciones expuestas. Esta búsqueda se realizará entre las 16 UPEC *Int1*<sup>+</sup> *intII*<sup>-</sup> *sul1*<sup>+</sup>.
2. Hacer una búsqueda sistemática por PCR de secuencias de la plataforma conservada del *Int1* en las 164 cepas de UPEC de la colección catalogadas hasta ahora como carentes del *Int1*. En principio, las secuencias a buscar serían las del promotor *Pc* y las del gen *qacEΔ*, que son típicamente integrantes de los *Int1*. Correlacionar la presencia de restos de *Int1* con los fenotipos de resistencia a sulfamidas y a trimetoprim de las cepas. La idea es evaluar hasta qué punto las resistencias a antifolatos están vinculadas a los integrones de clase 1.
3. Extender los estudios de transferencia horizontal al conjunto de 19 UPEC de la colección que contienen un integrón de clase 2. Estos elementos genéticos están también vinculados a los antifolatos porque contienen en su estructura permanente el gen *dfrA1*, de resistencia a trimetoprim.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

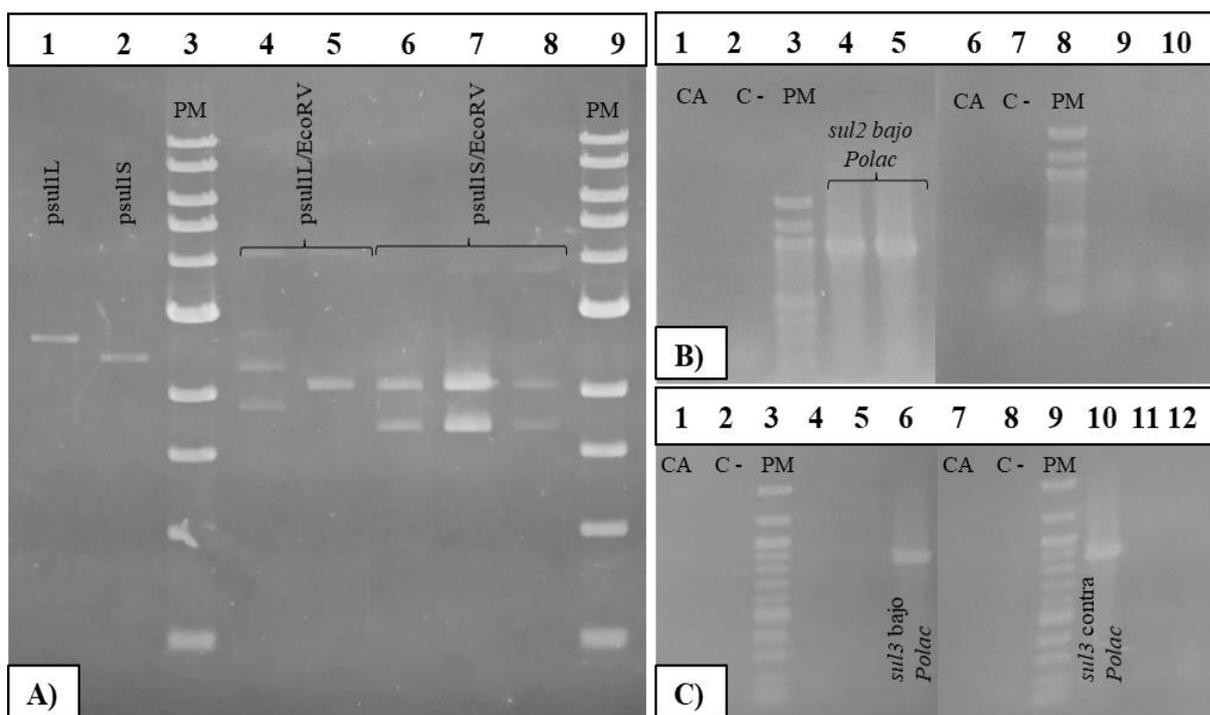
- Aminov, R.I. & Mackie, R.I. (2007) “Evolution and ecology of antibiotic resistance genes”, FEMS Microbiology Letters, 271 (2), pp. 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C. & Peixe, L. (2005) “Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons”, Antimicrobial agents and chemotherapy, 49 (2), pp. 836-839. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
- Azpiroz, M.F., Poey, M.E. & Laviña, M. (2009) “Microcins and urovirulence in *Escherichia coli*”, Microbial pathogenesis, 47 (5), pp. 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.09.003>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A & Wright, G.D. (2012) “Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome”, PLoS ONE, 7 (4), pp. e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Cambray, G., Guerout, A.M. & Mazel, D. (2010) “Integrons”, Annual review of genetics, 44, pp. 141-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
- Chowdhury, P.R., Ingold, A., Vanegas, N., Martínez, E., Merlino, J., Merkier, A. K., ... & Stokes, H.W. (2011) “Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study”, Antimicrobial agents and chemotherapy, 55 (7), pp. 3140-3149. <http://doi.org/10.1128/AAC.01529-10>
- Dawes, F.E., Kuzevski, A., Bettelheim, K.A., Hornitzky, M.A., Djordjevic, S.P. & Walker, M.J. (2010) “Distribution of class 1 integrons with IS 26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin”, PLoS ONE, 5 (9), pp. e12754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012754>
- de los Santos, E., Laviña, M., & Poey, M.E. (2021) “Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*”, Microbial Pathogenesis, 161, pp. 105206. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105206>
- Domingues, S., Da Silva, G.J. & Nielsen, K.M. (2015) “Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons”, Microbiology, 161 (7), pp. 1313-1337. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000099>
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., ... & Trautmann, M. (2017) “Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?”, GMS Hygiene and Infection Control, 12 (Doc05), pp. 1-24. <http://doi.org/10.3205/dgkh000290>
- Green, J.M. & Matthews, R.G. (2007) “Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylation and the interconversion of folate derivatives”, EcoSal Plus, 2 (2). <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.6>
- Huovinen, P. (2001) “Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole”, Clinical infectious diseases, 32 (11), pp. 1608-1614. <https://doi.org/10.1086/320532>
- Jove T., Da Re S., Denis F., Mazel D., Ploy M.C., (2010) “Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons”, PLoS Genet. 6 (1), e1000793, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>
- Labbate, M., Case, R.J. & Stokes, H.W. (2009) “The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation”, Horizontal gene transfer, 532, pp. 103-125. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_6)
- Leverstein-van Hall, M.A., Blok, H.E.M, Donders, A.R.T, Paauw, A., Fluit, A.C. & Verhoef, J. (2003) “Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with

the presence of integrons and is independent of species or isolate origin”, *The Journal of infectious diseases*, 187 (2), pp. 251-259. <https://doi.org/10.1086/345880>

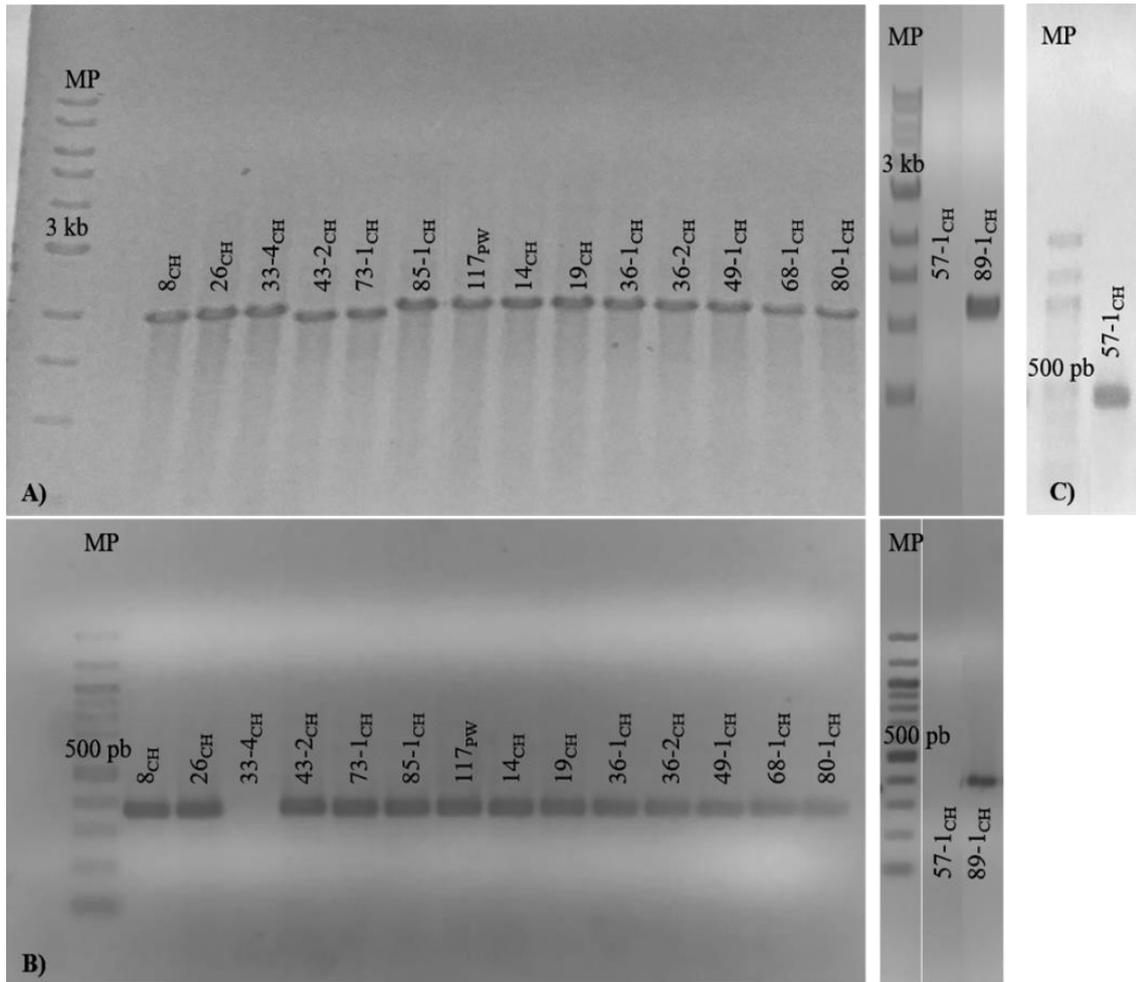
- Márquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernández, J., Gestal, A.M., Holley, M., ... & Stokes, H.W. (2008) “Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination”, *Journal of clinical microbiology*, 46 (10), pp. 3417-3425. <http://doi.org/10.1128/JCM.00835-08>
- Mathai, E., Grape, M., Kronvall, G. (2004) “Integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in southern India”, *Journal of pathology, microbiology and immunology*, 112, pp. 159-164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120301.x>
- Miller, J.H. (1992) “A short course in bacterial genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria”, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press. ISBN: 0-87969-349-5
- Minato, Y., Dawadi, S., Kordus, S.L., Sivanandam, A., Aldrich, C.C. & Baughn, A. D. (2018) “Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole”, *Nature communications*, 9 (1), pp. 1-7. <http://doi.org/10.1038/s41467-018-03447-x>.
- Neidhardt, F.C. (1996) “*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology”, 2nd edition, Washington, DC: ASM Press. ISBN: 1-55581-084-5
- Nunes, O.C., Manaiá, C.M., Kolvenbach, B.A., & Corvini, P.F.X. (2020) “Living with sulfonamides: a diverse range of mechanisms observed in bacteria”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (24), pp. 10389-10408. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10982-5>
- Partridge, S.R. (2011) “Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria”, *FEMS microbiology reviews*, 35 (5), pp. 820-855. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>
- Poey, M.E., Albiní, M., Saona, G. & Laviña, M. (2012) “Virulence profiles in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from pregnant women and children with urinary tract abnormalities”, *Microbial pathogenesis*, 52 (5), pp. 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.02.006>
- Poey, M.E., Azpiroz, M.F. & Lavina, M. (2019) “On sulfonamide resistance, sul genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*”, *Microbial pathogenesis*, 135, pp. 103611. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103611>
- Poey, M.E. & Laviña, M. (2014) “Integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and their relationship with phylogeny and virulence”, *Microbial pathogenesis*, 77, pp. 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.002>
- Poey, M.E. & Laviña D.M. (2018) “Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12”, *Microbial Pathogenesis*, 117, pp. 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.006>
- Razavi, M., Marathe, N.P., Gillings, M.R., Flach, C.F., Kristiansson, E. & Larsson, D.J. (2017) “Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene”, *Microbiome*, 5 (1), pp. 1-12. <http://doi.org/10.1186/s40168-017-0379-y>
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E.P., ... & de la Cruz, F. (2020) “Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids”, *Nature communications*, 11 (3602), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>
- Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., & Erill, I. (2019) “Origin of the mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates”, *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 3332. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03332>

- Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Llagostera, M., Barbé, J., & Erill, I. (2020) “Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim”, *Microbial genomics*, 6 (11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000440>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Manitis, T. (1989) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd edition, New York: Cold spring harbor laboratory press. ISBN: 0-87969-309-6.
- Sköld, O. (2001) “Resistance to trimethoprim and sulfonamides”, *Veterinary research*, 32 (3-4), pp. 261-273. <http://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
- Sunde, M., Simonsen, G.S., Slettemeås, J.S., Böckerman, I. & Norström, M. (2015) “Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs”, *PLoS ONE*, 10 (6), pp. e0128797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128797>
- Trobos, M., Christensen, H., Sunde, M., Nordentoft, S., Agersø, Y., Simonsen, G.S., ... & Olsen, J.E. (2009) “Characterization of sulphonamide-resistant *Escherichia coli* using comparison of *sul2* gene sequences and multilocus sequence typing”, *Microbiology*, 155 (3), pp. 831-836. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024190-0>
- Vedantam, G., Guay, G.G., Austria, N.E., Doktor, S.Z. & Nichols, B.P. (1998) “Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42 (1), pp. 88-93. <http://doi.org/10.1128/AAC.42.1.88>
- Wernli, D., Jørgensen, P.S., Parmley, E.J., Troell, M., Majowicz, S., Harbarth, S., ... y Pittet, D. (2020) “Evidence for action: a One Health learning platform on interventions to tackle antimicrobial resistance”, *The Lancet Infectious Diseases*, 20 (12), pp. e307–e311. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30392-3](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30392-3)
- World Health Organization (2019) “New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis”, Disponible en: [https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis?utm\\_campaign=news&utm\\_medium=miragenews&utm\\_source=miragenews](https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis?utm_campaign=news&utm_medium=miragenews&utm_source=miragenews) [Consultado 25/11/21]
- World Health Organization (2021a) “Antimicrobial resistance”. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [Consultado 24/11/21]
- World Health Organization (2021b) “WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021”. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02> [Consultado 25/11/21]
- Zhang, A.N., Li, L.G., Ma, L., Gillings, M.R., Tiedje, J.M. & Zhang, T. (2018) “Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection”, *Microbiome*, 6 (130), pp. 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0516-2>

APÉNDICE I: Figuras



**Fig. S1. Orientación de los insertos en los plásmidos psul1L, psul1S, psul2 y psul3.** **A)** Gel de agarosa 0,8%. 1) psul1L entero, 2) psul1S entero, 3) y 9) Marcador de peso molecular de 1 Kb (Biolabs), 4-8) plásmidos de diferentes clones digeridos según se indica en la figura. **B)** Gel de 1% de agarosa. Orientación del fragmento de 943 pb clonado en psul2 de dos clones: 1) y 6) control de la reacción, 2) y 7) control negativo con plásmido vector, 3) y 8) Marcador de peso molecular de 100 pb (Biolabs), 4) y 5) amplificación con los cebadores reverso y FINsul2R (Tm= 57°C, hay amplificación si *sul2* está a favor del *POLac*), 9) y 10) amplificación con los cebadores reverso y SDSul2F (Tm= 57°C, si hay amplificación está en contra del *POLac*). **C)** Gel de 1% de agarosa. Orientación del fragmento de 879 pb clonado en psul3 de tres clones: 1) y 7) control de la reacción, 2) y 8) control negativo con plásmido vector, 3) y 9) Marcador de peso molecular de 100 pb (Biolabs), 4-6) amplificación con los cebadores reverso y FINsul3R (Tm= 56°C, si hay amplificación está a favor del *POLac*), 10-12) amplificación con los cebadores reverso y SDSul3F (Tm= 55°C, si hay amplificación está en contra del *POLac*).

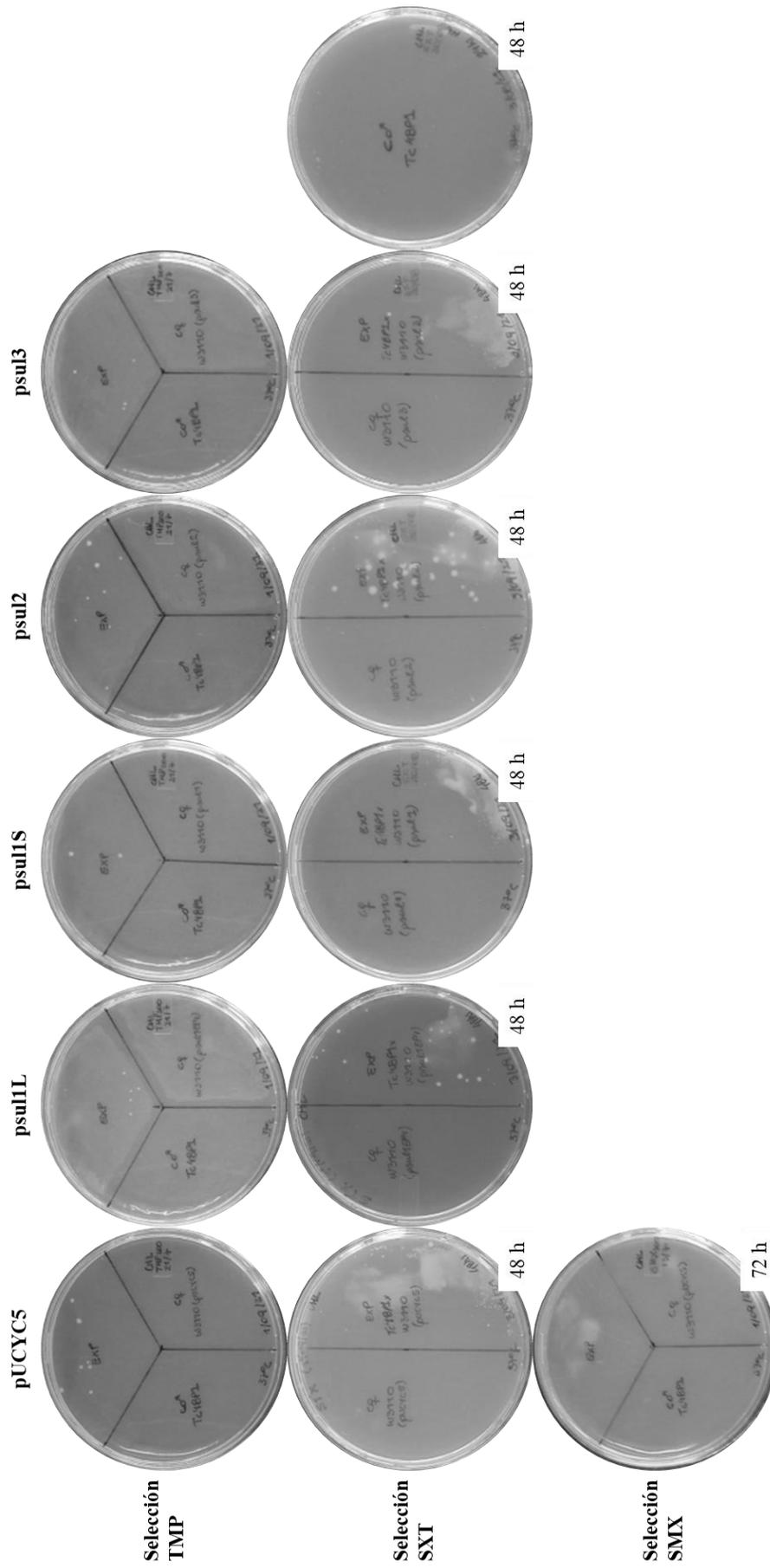


**Fig. S2. Geles de agarosa entre 0,8 y 2% con amplificaciones de los distintos segmentos del *Int1* en las 16 cepas *intII<sup>+</sup> sulI<sup>+</sup>*. A) Amplificación de la región variable, B) amplificación del promotor *Pc*, y C) amplificación del gen *qacEA*. MP, marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb Biolabs, se indican las bandas de 3 kb y de 500 pb, respectivamente.**

**Fig. S3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FolP de las tres cepas resistentes a sulfamida carentes de genes *sul*: 87<sub>PW</sub>, 35-1<sub>CH</sub> y 40-1<sub>CH</sub> (\*)**

W3110	MKLFAQGTSLDLSPHVMGILNVT	PDSFSDGGTHNSLIDAVKHANL	MINAGATI	IDVGGESTRPGAAEVS	70
87 <sub>PW</sub>	MKLFAQGTSLDLSPHVMGILNVT	PDSFSDGGTHNSLIDAVKHANL	MINAGATI	IDVGGESTRPGAAEVS	70
35-1 <sub>CH</sub>	MKLFAQGTSLDLSPHVMGILNVT	PDSFSDGGTHNSLIDAVKHANL	MINAGATI	IDVGGESTRPGAAEVS	70
40-1 <sub>CH</sub>	MKLFAQGTSLDLSPHVMGILNVT	PDSFSDGGTHNSLIDAVKHANL	MINAGATI	IDVGGESTRPGAAEVS	70
W3110	VEEELQRVIPVVEAIAQRFEVWIS	VDTSKPEVIRESAKVG	GAHI	INDIRSLSEPGALEAAAETGLPVCLMH	140
87 <sub>PW</sub>	VEEELQRVIPVVEAIAQRFEVWIS	VDTSKPEVIRESAKVG	GAHI	INDIRSLSEPGALEAAAETGLPVCLMH	140
35-1 <sub>CH</sub>	VEEELQRVIPVVEAIAQRFEVWIS	VDTSKPEVIRESAKVG	GAHI	INDIRSLSEPGALEAAAETGLPVCLMH	140
40-1 <sub>CH</sub>	VEEELQRVIPVVEAIAQRFEVWIS	VDTSKPEVIRESAKVG	GAHI	INDIRSLSEPGALEAAAETGLPVCLMH	140
W3110	MQGNPKTMQEAPKYDDVFAEVNRY	FIEQIARCEQAGIAKEK	LLD	PGFGFGKNSHNYSL	LARLAEFHHF
87 <sub>PW</sub>	MQGNPKTMQEAPKYDDVFAEVNRY	FIEQIARCEQAGIAKEK	LLD	PGFGFGKNSHNYSL	LARLAEFHHF
35-1 <sub>CH</sub>	MQGNPKTMQEAPKYDDVFAEVNRY	FIEQIARCEQAGIAKEK	LLD	PGFGFGKNSHNYSL	LARLAEFHHF
40-1 <sub>CH</sub>	MQGNPKTMQEAPKYDDVFAEVNRY	FIEQIARCEQAGIAKEK	LLD	PGFGFGKNSHNYSL	LARLAEFHHF
W3110	NLPLLVGMSRKSMIGQLLN	VGPSE	RLSGSLACAVIAAMQGAHI	IRVHDVKETVEAMRV	VEATLSAKENKR
87 <sub>PW</sub>	NLPLLVGMSRKSMIGQLLN	VGPSE	RLSGSLACAVIAAMQGAHI	IRVHDVKETVEAMRV	VEATLSAKENKR
35-1 <sub>CH</sub>	NLPLLVGMSRKSMIGQLLN	VGPSE	RLSGSLACAVIAAMQGAHI	IRVHDVKETVEAMRV	VEATLSAKENKR
40-1 <sub>CH</sub>	NLPLLVGMSRKSMIGQLLN	VGPSE	RLSGSLACAVIAAMQGAHI	IRVHDVKETVEAMRV	VEATLSAKENKR
W3110	YE	282			
87 <sub>PW</sub>	YE	282			
35-1 <sub>CH</sub>	YE	282			
40-1 <sub>CH</sub>	YE	282			

(\*) En verde, residuos distintos a los de FolP de la cepa de referencia *E. coli* K12 W3110



**Fig. S4. Conjugaciones entre la donante del Int1 *E. coli* K12 BZB1011 *AhsR::kan* (p48-1CH) y las receptoras *E. coli* K12 W3110 (con un plásmido vector o con recombinantes *suI*).** Las placas están divididas en tercios para sembrar en cada una de ella 50 µl de control donante, control receptora y experimental o al medio sembrando el control receptor y el experimental y una única placa conteniendo el control donante. Las placas de selección con SXT son de una siembra de un volumen 5 veces mayor que el de la selección TMP. Las colonias experimentales surgidas con las receptoras portadoras de los plásmidos pUCYC5 o psu1S, resultaron no ser transconjugantes.

## APÉNDICE II: Medio de cultivo

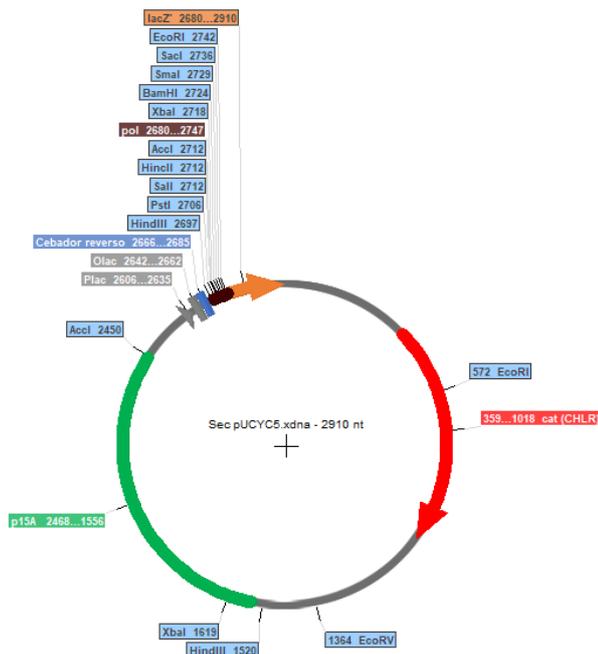
### Medio nutriente Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992)

Contenido por litro de solución:

Bacto-Triptona.....	10 g
Bacto-Extrato de Levadura.....	5 g
NaCl.....	10 g

El medio sólido se prepara añadiendo 15 g de agar por litro de medio de cultivo. Se esteriliza por autoclave (30 min a 121°C).

## ANEXO: Mapa físico y genético del plásmido pUCYC5



```

tgtccggcgggtgcttttgcggttacgcaccaccccgctcagtagctgaacaggaggacagctgatagaaa < 70
acaggccgcaccgaaaacggcaatgctggtggggcagtcacgcacttgtcctccctgtcgactatcttt
    10      20      30      40      50      60

cagaagccactggagcacctcaaaaacaccatcatacactaaatcagtaagttggcagcatcacccgacg < 140
gtcttcggtgacctcgtggagttttgtggtagtagtgatttagtcattcaaccgctcgtagtgggctgc
    80      90      100     110     120     130

cactttgcccgaataaatacctgtgacggaagatcacttcgcagaataaataaatcctggtgtccctgt < 210
gtgaaacggcgttatttatggacactgccttctagtgaaagcgtcttatttatttaggaccacgggaca
    150     160     170     180     190     200

tgataccggaagccctggccaacttttggcgaaaatgagacggttgatcggcacgtaagaggttccaac < 280
actatggccttcgggaccgggttgaaaaccgcttttactctgcaactagccgtgcattctccaaggttg
    220     230     240     250     260     270

ttcaccataatgaataagatcactaccggcgtatTTTTTgagttatcgagattttcagagctaagg < 350
aaagtggtattactttattctagtgatggccgcataaaaaactcaatagctctaaaagtcctcgattcc
    290     300     310     320     330     340

>cat (CHLR)
|
aagctaaaATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACA < 420
      M E K K I T G Y T T V D I S Q W H R K E H
ttcgattTACCTCTTTTTTTAGTGACCTATATGGTGGCAACTATATAGGGTTACCGTAGCATTCTTGT
    360     370     380     390     400     410

TTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTACGGCCTTT < 490
      F E A F Q S V A Q C T Y N Q T V Q L D I T A F
AAACTCCGTAAAGTCAGTCAACGAGTTACATGGATATTGGTCTGGCAAGTCGACCTATAATGCCGGAAA
    430     440     450     460     470     480

TTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTTCACATTCTTGCCCGCCTGATGA < 560
      L K T V K K N K H K F Y P A F I H I L A R L M N
AATTTCTGGCATTCTTTTTATTTCGTGTTCAAAATAGGCCGGAAATAAGTGTAAAGAACGGGCGGACTACT
    500     510     520     530     540     550
    
```

EcoRI (\*)  
 |  
 ATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCTTG < 630  
 A H P E F R M A M K D G E L V I W D S V H P C  
 TACGAGTAGGCCTTAAGGCATACCGTTACTTTCTGCCACTCGACCACTATACCCTATCACAAGTGGGAAC  
 570 580 590 600 610 620

TTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGG < 700  
 Y T V F H E Q T E T F S S L W S E Y H D D F R  
 AATGTGGCAAAGGTACTCGTTTACTTTGCAAAGTAGCGAGACCTCACTTATGGTGCTGCTAAAGGCC  
 640 650 660 670 680 690

CAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGT < 770  
 Q F L H I Y S Q D V A C Y G E N L A Y F P K G F  
 GTCAAAGATGTGTATATAAGCGTTCTACACCGCACAAATGCCACTTTTGGACCGGATAAAGGGATTTCCCA  
 710 720 730 740 750 760

TTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGC < 840  
 I E N M F F V S A N P W V S F T S F D L N V A  
 AATAACTCTTATACAAAAAGCAGAGTCGGTTAGGGACCCACTCAAAGTGGTCAAACCTAAATTTGCACCG  
 780 790 800 810 820 830

CAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTG < 910  
 N M D N F F A P V F T M G K Y Y T Q G D K V L  
 GTTATACCTGTTGAAGAAGCGGGGCAAAGTGGTACCCGTTTATAATATGCGTTCGCTGTTCCACGAC  
 850 860 870 880 890 900

ATGCCGCTGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAAT < 980  
 M P L A I Q V H H A V C D G F H V G R M L N E L  
 TACGGCGACCGTAAGTCCAAGTAGTACGGCAGACACTACCGAAGGTACAGCCGTCTTACGAATTACTTA  
 920 930 940 950 960 970

TACAACGACTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAA tttttttaaggcagttattggtgccccttaaac < 1050  
 Q Q Y C D E W Q G G A \*  
 ATGTTGTCAATGACGCTACTCACCGTCCCGCCCCGATT aaaaaaattccgtcaataaccacgggaatttg  
 990 1000 1010 1020 1030 1040

gcctggtgctacgcctgaataaagtataataagcggatgaatggcagaaattcgaaagcaaattcgaccc < 1120  
 cggaccacgatgcccacttattcactattattcgccacttaccgtctttaagctttcgtttaagctggg  
 1060 1070 1080 1090 1100 1110

ggtcgtcggttcagggcagggcggttaaatagccgcttatgtctattgctggtttaccggtttattgact < 1190  
 ccagcagccaagtcccgtcccagcaatttatcggcgaatacagataacgaccaaattggccaaataactga  
 1130 1140 1150 1160 1170 1180

accggaagcagtgtagccgtgtgcttctcaaatgcctgagccagtttgctcaggctctccccgtggagg < 1260  
 tggccttcgctcacactggcacacgaagagtttacggactccggcacaacaggtccgagagggcacctcc  
 1200 1210 1220 1230 1240 1250

taataattgacgatatgatcatttattctgctcccagagcctgataaaaaacggttagcgttagcagcac < 1330  
 attattaactgctataactagtaaataagacggagggtctcggactatTTTTGccaatcgcgatcgtcgtg  
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

EcoRV  
 |  
 gccatagtgactggcgtgctgctggaatggacgatatcccgaagaggcccggcagtagccgcataaacc < 1400  
 cggatcactgaccgctacgacagccttacctgctataggcgtttctccgggccgtcatggccgtattgg  
 1340 1350 1360 1370 1380 1390

aagcctatgcctacagcatccaggggtgacggtgccgaggatgacgatgagcgcattggttagatttcatac < 1470  
 ttcggatacggatgtcgtaggtcccactgcccacggctcctactgctactcgcgtaacaatctaaagtatg  
 1410 1420 1430 1440 1450 1460

HindIII (\*)  
 |  
 acggtgctgactgctgtagcaatttaactgtgataaactaccgcattaaagcttatcgatgataagctg < 1540  
 tgccacggactgacgcaatcggttaaattgacactatTTTgatggcgtaatttcgaatagctactattcgac  
 1480 1490 1500 1510 1520 1530

p15A  
|

tcaaacatgagaatt**ACAACCTTATATCGTATGGGGCTGACTTCAGGTGCTACATTTGAAGAGATAAAATTG** < 1610  
 agtttgtactcttaa**TGTTGAATATAGCATACCCCGACTGAAGTCCACGATGTAAACTTCTCTATTTAAC**  
                   1550          1560          1570          1580          1590          1600

XbaI (\*)  
|

**CACTGAAATCTAGAAATATTTTATCTGATTAATAAGATGATCTTCTTGAGATCGTTTTGGTCTGCGCGTA** < 1680  
**GTGACTTTAGATCTTTATAAAAATAGACTAATTTATTCTACTAGAAGAACTCTAGCAAACCAGACGCGCAT**  
                   1620          1630          1640          1650          1660          1670

**ATCTCTTGCTCTGAAAACGAAAAACCGCCTTGACGGGCGGTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTACCAACT** < 1750  
**TAGAGAACGAGACTTTTGCTTTTTTGGCGGAACGTCCCGCCAAAAGCTTCCAAGAGACTCGATGGTTGA**  
                   1690          1700          1710          1720          1730          1740

**CTTTGAACCGAGGTAACGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAACTTGTCTTTCAGTTTAGCCTTAACC** < 1820  
**GAAACTTGCTCCATTGACCGAACCTCCTCGCGTCAGTGGTTTTGAACAGGAAAGTCAAATCGGAATTGG**  
                   1760          1770          1780          1790          1800          1810

**GGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGTCTTTTGCATG** < 1890  
**CCGCGTACTGAAGTTCTGATTTGAGGAGATTTAGTTAATGGTCACCGACGACGGTCACCACGAAAACGTAC**  
                   1830          1840          1850          1860          1870          1880

**TCTTTCCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGACTGAACGGGGGGTTCCG** < 1960  
**AGAAAGGCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCGCGTCCGACGCTGACTTGCCCCCAAGC**  
                   1900          1910          1920          1930          1940          1950

**TGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAACAGTGTGAGGCGTGGAATGAGACAAACGC** < 2030  
**ACGTATGTCAGGTCGAACCTCGCTTGACGGATGGGCCTTGACTCACAGTCCGCACCTTACTCTGTTTGGC**  
                   1970          1980          1990          2000          2010          2020

**GGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAG** < 2100  
**CCGGTATTGTCGCCTTACTGTGGCCATTTGGCTTTCCGTCTTGTCTCTCGCGTGTCCCTCGGGCGTC**  
                   2040          2050          2060          2070          2080          2090

**GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCGTGTCGGGTTTCGCCACCAGTATTTGAGCGTCAGATTTCTGTG** < 2170  
**CCCCTTTGCGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGTGACTAAACTCGCAGTCTAAAGCAC**  
                   2110          2120          2130          2140          2150          2160

**ATGCTTGTGAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGGCTTTGCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTTAAGTA** < 2240  
**TACGAACAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTTGCAGAAACGGCGCCGGGAGAGTGAAGGGACAATTCAT**  
                   2180          2190          2200          2210          2220          2230

**TCTTCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCGTTTCGTAAGCCATTTCCGCTCGCCGAGTCGAACGAC** < 2310  
**AGAAGGACCGTAGAAGTCTCTTTAGAGGCGGGCAAGCATTCCGGTAAAGGCGAGCGGCGTCAGCTTGCTG**  
                   2250          2260          2270          2280          2290          2300

**CGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAATATATCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGT** < 2380  
**GCTCGCATCGCTCAGTCACTCGCTCCTTCGCCTTATATAGGACATAGTGTATAAGACGACTGCGTGGCCA**  
                   2320          2330          2340          2350          2360          2370

AccI (\*)  
|

**GCAGCCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAGCACTTCACTGACACCCTCATCAGTGCCAACATAGTAAGCCAG** < 2450  
**CGTCGGAAAAAAGAGGACGGTGTACTTCCGTGAAGTGACTGTGGGAGTAGTCACGGTTGTATCATTCGGTC**  
                   2390          2400          2410          2420          2430          2440

**TATACACTCCGCTAGCGC**ccaataacgcaaaccgcctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagct < 2520  
**ATATGTGAGGCGATCGCG**ggttatgcgtttggcggagagggcgcgcaaccggctaagtaattacgtcga  
                   2460          2470          2480          2490          2500          2510

ggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgcaattaatgtgagtttagctcactca < 2590  
 ccgtgctgtccaaagggtgacctttcgcccgtcactcgcggttgcggttaattacactcaatcgagtgagt  
                   2530          2540          2550          2560          2570          2580

```

                >Plac                                Olac
                |                                  |
ttaggcaccccaggcTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTgtgtggAATTGTGAGCGGATAACAA < 2660
aatccgtgggtccgAAATGTGAAATACGAAGGCCGAGCATACAACacacaccTTAACACTCGCCTATTGTT
                2600          2610          2620          2630          2640          2650

                                                XbaI (*)

                >Cebador reverso          Polylinker          HindIII          PstI          SalI          AccI (*)          SmaI
                |          |          |          |          |          |          |          |          |
TTTcacacaggaaacagctATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCC < 2730
                M T M I T P S L G C R S T L E D P
AAagtgtgtcctttgtcgaTACTGGTACTAATGCGGTTTCGAACCCGACGTCCAGCTGAGATCTCCTAGGG
                2670          2680          2690          2700          2710          2720

                SacI          EcoRI (*)
                |          |
CGGGCGAGCTCGAATTCACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC < 2800
R A S S N S L A V V L Q R R D W E N P G V T Q L
GCCCCTCGAGCTTAAGTGACCCGGCAGCAAATGTTGCAGCACTGACCCCTTTGGGACCCGAATGGGTTG
                2740          2750          2760          2770          2780          2790

TTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC < 2870
N R L A A H P P F A S W R N S E E A R T D R P
AATTAGCGGAACGTCGTGTAGGGGAAAGCGGTCGACCGCATTATCGCTTCTCCGGGCGTGGCTAGCGGG
                2810          2820          2830          2840          2850          2860

TTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGA < 2910
S Q Q L R S L N G E W R *
AAGGTTTGTCAACGCGTCGGACTTACCGCTTACCGCGACT
                2880          2890          2900

```

Features :

```

cat (CHLR)          : [359 : 1018]
p15A                : [2468 : 1556]
Plac                : [2606 : 2635]
Olac                : [2642 : 2662]
lacZ'              : [2680 : 2910]
Polylinker         : [2680 : 2747]
Cebador reverso    : [2666 : 2685]

```

(\*) Enzimas con dos sitios de corte

Mapa físico y enzimático optimizado con el programa Serial Cloner V2.5