

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Trabajo final de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación en Microbiología

**“Localización y transferencia horizontal de integrones de clase
2 en *Escherichia coli*”**

Martina Vázquez

Tutora: Dra. Ma. Eloísa Poey. Sección de Fisiología & Genética Bacterianas,
Facultad de Ciencias

Tribunal: Dra. Silvia Batista, Dra. Fernanda Azpiroz y Dra. Ma. Eloísa Poey

Montevideo, Uruguay
2023

RESUMEN

El empleo de los antibióticos para combatir las infecciones bacterianas marcó un punto crucial en la humanidad, aumentando la esperanza de vida en unos 20 años. Sin embargo, paralelamente a su uso se fueron detectando bacterias patógenas resistentes y, más recientemente, multirresistentes. Este es un tema de preocupación mundial en salud y un aspecto relevante es conocer las distintas vías que tienen los genes de resistencia para diseminarse entre las bacterias.

Los integrones de clase 1 y 2 son elementos genéticos no autorreplicativos que portan genes de resistencia antibiótica. Se localizan en transposones y/o en plásmidos, principalmente conjugativos, lo que permite su diseminación entre las bacterias. En este estudio nos centramos en el integrón de clase 2 (Int2). Se ha descrito que éstos se localizan en el transposón Tn7, un transposón con la particularidad de saltar, además de al azar, a un sitio cromosómico en *Escherichia coli* (el sitio *attTn7*). Los objetivos de este trabajo fueron: i) analizar, *in silico*, la distribución del Int2 y corroborar su asociación con el Tn7; ii) corroborar la presencia del Int2 y determinar su localización en una colección de cepas de *E. coli* uropatógeno (UPEC), previamente caracterizada, y iii) analizar la transferencia horizontal del Int2 desde las cepas de UPEC Int2⁺ a *E. coli* K12 y determinar su localización en estas últimas. Para ello, se emplearon técnicas de PCR y ensayos de transferencia horizontal por conjugación. Los resultados de los análisis *in silico* permitieron corroborar la vinculación estricta del Int2 con el Tn7, por lo que en más nos referiremos al Tn7. El Tn7 se distribuyó en ciertas familias de las Gammaproteobacterias. La mayoría (83%) de las cepas de la colección de UPEC presentaron el Tn7 en su sitio *attTn7*. El Tn7 se transfirió por conjugación en cuatro casos (24%) desde las cepas de UPEC a una *E. coli* K12. En tres de éstos el Tn7 estuvo portado en plásmidos y, muy probablemente, estaría mutado para el salto: no se localizó ni en las donantes ni en las receptoras en el sitio *attTn7*. En el cuarto caso el Tn7 fue transferido y, una vez ingresado, inmediatamente saltó a su sitio cromosómico; tanto la donante UPEC como la receptora *E. coli* K12 presentaron una copia del Tn7 en el sitio *attTn7*. En suma, en este trabajo se corroboró la estricta vinculación del Int2 con el Tn7, así como la capacidad de este transposón de transferirse naturalmente entre cepas de UPEC y *E. coli* K12. Sin duda que conocer los mecanismos que tiene el Tn7 para asegurar su transferencia vertical así como horizontal en las comunidades bacterianas es importante para comprender las posibles vías de diseminación de las resistencias y, por ende, el surgimiento de posibles patógenos multirresistentes.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	7
II.1) Objetivo General	7
II.2) Objetivos específicos.....	7
III. MATERIALES & MÉTODOS	8
III.1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	8
III.2) Análisis <i>in silico</i> de la localización del Tn7	8
III.3) Análisis genotípicos.....	9
III.3.1) Determinación de la presencia de Int1, Int2 y <i>sul2</i> , y de la localización del Tn7.....	9
III.4) Análisis fenotípicos de resistencia antibiótica	10
III.5) Conjugaciones.....	10
IV. RESULTADOS	11
IV.1) Análisis <i>in silico</i> de la distribución y de la localización del Tn7.....	11
IV.2) Análisis genotípicos y fenotípicos de las cepas de UPEC Int2 ⁺	13
IV.2.1) Determinación de la presencia del Int2.....	13
IV.2.2) Análisis fenotípicos de la resistencia antibiótica	13
IV.2.3) Localización cromosómica del Tn7 en las cepas de la colección de UPEC Int2 ⁺ ..	15
IV.3) Conjugaciones de cepas de UPEC Int2 ⁺ con la cepa de <i>E. coli</i> K12 BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (1 ^{era} etapa de conjugación).....	17
IV.3.1) Análisis de la presencia de <i>intI2</i> en los transconjugantes de contexto BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> TMP ^R	17
IV.3.2) Localización del Tn7 en los transconjugantes de contexto BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> TMP ^R Int2 ⁺	18
IV.3.3) Análisis de la presencia del Int1 y de <i>sul2</i> en los transconjugantes BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> TMP ^R Int2 ⁺	19
IV.3.4) Análisis fenotípicos de los transconjugantes BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> TMP ^R Int2 ⁺ ..	20
IV.4) Conjugaciones entre las cepas de <i>E. coli</i> K12 BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> TMP ^R Int2 ⁺ y W3110 <i>srl::Tn10</i> (2 ^{da} etapa de conjugación)	23
IV.4.1) Análisis de la presencia de <i>intI2</i> , <i>dfrA1</i> y de <i>sul2</i> en los transconjugantes W3110 <i>srl::Tn10</i> TMP ^R	24
IV.4.2) Localización del Tn7 en los transconjugantes de contexto W3110 <i>srl::Tn10</i>	25
IV.4.3) Análisis fenotípicos de los transconjugantes W3110 <i>srl::Tn10</i> TMP ^R Int2 ⁺	26
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	32
VII. REFERENCIAS	33
VIII. ANEXOS.....	36

I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos antibacterianos se han empleado de forma terapéutica para combatir infecciones desde hace menos de 100 años. Su uso aumentó significativamente la expectativa de vida de las personas. Es así que el estudio de los mismos se intensificó, logrando el descubrimiento de nuevos antibióticos naturales (producidos por microorganismos), el desarrollo de derivados modificados de éstos (antibióticos semi-sintéticos) e incluso de completa síntesis química (antibióticos sintéticos). Sin embargo, poco tiempo después del comienzo de su uso se detectaron bacterias patógenas resistentes a alguno de los antibióticos y, más aún, comenzaron a registrarse bacterias patógenas multirresistentes. La aparición de este tipo de bacterias es un tema de preocupación actual en salud (WHO, 2017; Murray et al., 2022).

En las bacterias Gram negativas las resistencias antibióticas se deben frecuentemente a la presencia de genes específicos, portados por elementos genéticos móviles, por lo que la prevalencia de las resistencias se debe tanto a su expansión clonal como a la generación de nuevos clones por transferencia horizontal (Exner et. al., 2017, Poey & Laviña, 2018). Uno de los elementos genéticos estrechamente relacionados con las resistencias antibióticas son los integrones y, dentro de éstos, los de clase 1 y 2 (Int1 y 2), denominados integrones clínicos. En lo referente a su estructura, éstos poseen una plataforma conservada y una región variable (**Fig. 1**). La plataforma contiene un gen para una integrasa (*intI*), un sitio de integración, *attI*, y un promotor *Pc*. La región variable contiene uno o más “cassettes génicos”, que codifican para resistencias antibióticas, son integrados en el sitio *attI* por recombinación específica de sitio con su *attC* y se expresan bajo el promotor *Pc*. Los integrones se diferencian por la secuencia de su gen para la integrasa y en ello se basa su clasificación.

Los integrones clínicos están muy vinculados con la resistencia a los antibióticos antifolatos. Los antifolatos, i.e. las sulfamidas y el trimetoprim, son antibióticos sintéticos que actúan bloqueando la vía de síntesis del ácido fólico (vía Fol), una coenzima esencial que las bacterias deben sintetizar. Las sulfamidas, e.g. el sulfametoxazol (SMX), así como el trimetoprim (TMP), actúan como análogos metabólicos, inactivando la primera y la última enzima de la vía, respectivamente (Neidhart, 1996) (**Fig. 2**). Cada antibiótico por separado ejerce un efecto bacteriostático, pero su uso combinado genera un efecto sinérgico bactericida. Es así que en la clínica comúnmente se usa la fórmula combinada

sulfametoxazol- trimetoprim a la que se le denomina co-trimoxazol (SXT) (WHO, 2017). Concretamente, la resistencia a SMX se debe a la presencia de alguno de los genes *sul* (*sul1*, 2 ó 3), que codifican para variantes resistentes de la primera enzima, dihidropteroato sintasa, de la vía Fol (Antunes et al., 2005). Por su parte, la resistencia a TMP se debe a la presencia de genes *dfrA*, que codifican para variantes resistentes (más de 40 alelos distintos) de la última enzima, dihidrofolato reductasa, de la vía Fol (Sköld, 2001).

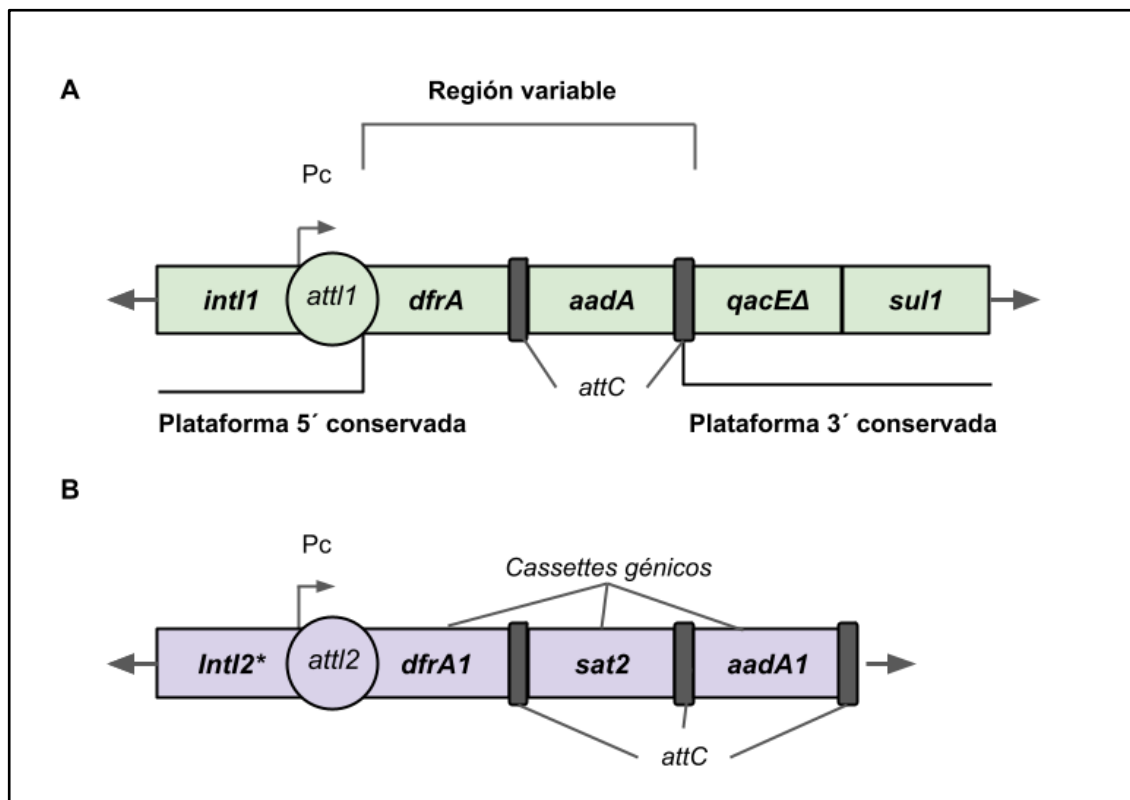


Fig. 1. Integrones de clase 1 y 2. A) Estructura de un ejemplo de Int1. Se representa la plataforma conservada 5', con el gen para la integrasa, *intI1*, y el sitio de "attachment" del integrón, *attI1*; la plataforma conservada 3' con el gen deletado *qacEΔ*, de resistencia a amonio cuaternario, y el gen *sul1*, de resistencia a sulfamidas. Se incluye la región variable del Int1 con los genes de resistencia (cassettes génicos) que más frecuentemente la integran, *dfrA* y *aadA*, de resistencia a trimetoprim y a estreptomicina, respectivamente. **B)** Estructura de un Int2, con el gen para su integrasa, *intI2*, interrumpido por un codón sin sentido (*), el sitio de "attachment", *attI2*, y los cassettes génicos *dfrA1* (de resistencia a trimetoprim), *sat2* (de resistencia a estreptotricina) y *aadA1* (de resistencia a estreptomicina). *Pc*, promotor; *attC*, sitio de "attachment" de los cassettes génicos.

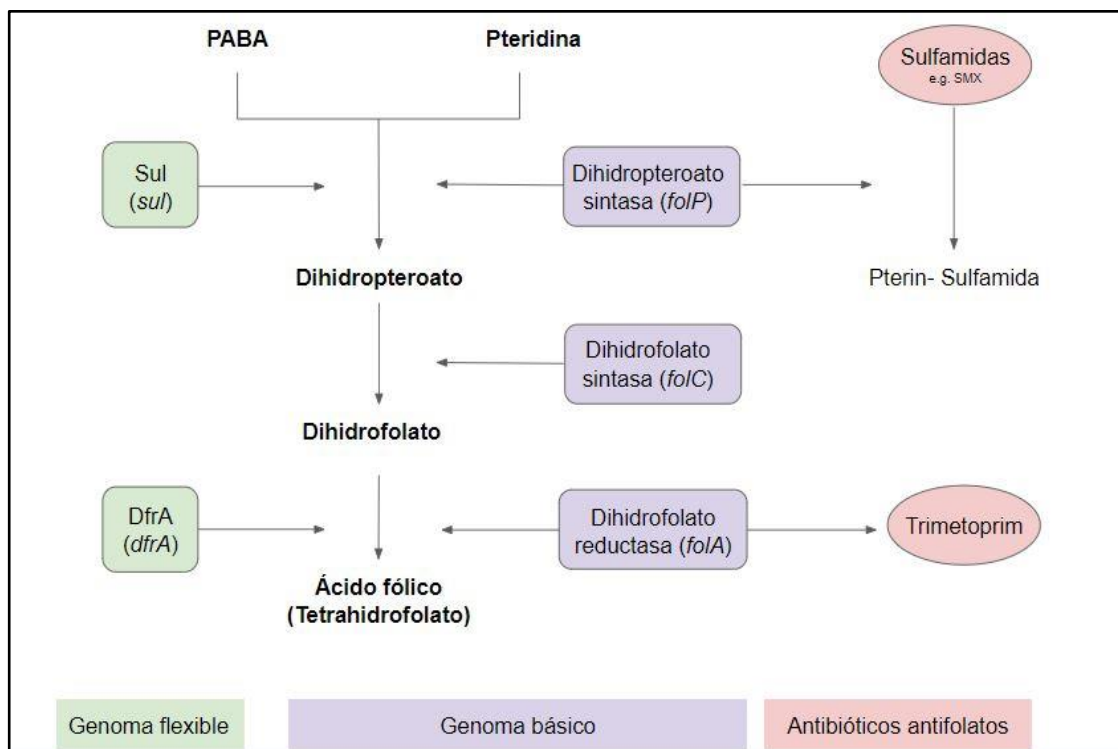


Fig 2. Vía de síntesis del ácido fólico (Vía Fol). En letra negra, productos intermediarios y final de la vía. En cuadro violeta, las enzimas participantes de la vía y los genes que las codifican, pertenecientes al genoma básico del cromosoma. En cuadro rosado, los inhibidores de la vía y su sitio de acción. En cuadro verde, las enzimas pertenecientes al genoma flexible que restituyen la vía de síntesis de ácido fólico en presencia de los inhibidores. PABA, ácido para-aminobenzoico; Sul, dihidropteroato sintasa resistente a sulfamidas; DfrA, dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprim; SMX, sulfametoxazol.

Los genes *sul* y *dfrA* están frecuentemente asociados a los integrones clínicos. Los Int1 son los más frecuentes en aislamientos clínicos de bacterias Gram negativas. En su plataforma conservada tienen el gen *sul1* y en la región variable suelen incluir uno o dos genes de resistencia antibiótica, generalmente de tipo *dfrA* (TMP^R) y *aadA* (resistencia al aminoglicósido estreptomicina, STR^R). Estos integrones se localizan tanto en el cromosoma como en plásmidos. Es importante destacar que los Int1 poseen una distribución acotada a sólo algunos grupos bacterianos. Se encuentran en bacterias Gram negativas, dentro de ellas en las Gammaproteobacterias y, a su vez, en algunas familias de esta división (Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae y Moraxellaceae) (Labbate et al., 2009; Cambray et al., 2010; Partridge, 2011; Domingues et al., 2012; Domingues et al., 2015; Deng et al., 2015; Cury et al., 2016; Poey & Laviña, 2018; Zhang et al., 2018).

En cuanto a los Int2, presentan una distribución semejante a la de los Int1 aunque son algo menos prevalentes que estos últimos (Deng et al., 2015). El Int2 ha perdido su

capacidad para integrar cassettes génicos debido a que el gen para su integrasa, *intI2*, está inactivado por una mutación que genera un codón de terminación. Por lo tanto, su estructura es fija. Además del gen *intI2* mutado, presentan los genes *dfrA1*, *sat2* (de resistencia a estreptotricina) y *aadA1* (STR^R) (Labbate et al., 2009; Cambray et al., 2010). Los Int2 se encuentran presentes dentro del transposón Tn7, de 14067 pb (**Fig. 3**) (Sundström et al., 1991). Dicho transposón codifica además para cinco proteínas de transposición, TnsA, TnsB, TnsC, TnsD y TnsE. TnsA y TnsB forman la transposasa, TnsC constituye un regulador que interacciona con la diana de ADN y la transposasa, mientras que TnsD y TnsE son factores específicos de diana que permiten la activación del “core” TnsABC para realizar las reacciones de transposición. Tn7 presenta extremos finales distintos; el extremo izquierdo Tn7-L, de 150 pb, y el extremo derecho Tn7-R, de 90pb, que permiten su integración con una orientación característica. En lo referente a la estructura del Tn7, las proteínas de transposición (TnsA, TnsB, TnsC, TnsD y TnsE) están codificadas en la región derecha, mientras que el Int2 está hacia la izquierda (**Fig. 3**).

Se ha propuesto que el Tn7 se transpone mediante “cut and paste”, o sea, en forma no replicativa. En este proceso el Tn7 es escindido de un sitio e insertado en otra posición dentro de la bacteria, generando la duplicación en la secuencia diana de 5 pb, es decir, repetidos directos de 5 pb flanqueando el transposón.

El Tn7 es considerado un elemento móvil sofisticado debido a que ha desarrollado vías alternativas para su propagación. Por un lado, el Tn7 se comporta como muchos de los elementos transponibles, i.e., los saltos son al azar con una baja frecuencia. Esta transposición está mediada por TnsABC+E. Si bien los saltos pueden ser a secuencias aleatorias del cromosoma, éstos ocurren preferentemente a plásmidos conjugativos una vez que ingresan a la célula. De esta manera, el Tn7 asegura su dispersión horizontal entre las bacterias (Kubo & Craig, 1990; Wolkow et al., 1996; Peters, 2014; Peters & Craig, 2001). En la otra vía de transposición, el Tn7 tiene la particularidad de insertarse con una alta frecuencia en un sitio específico (*attTn7*) en el cromosoma de la bacteria, lo que lo diferencia del resto de los transposones. Este mecanismo está mediado por TnsABC+D. Más precisamente, TnsD es el factor específico de diana que se une a una región conservada dentro de la región codificante del gen esencial *glmS*. Este gen codifica para una glucosamina 6- fosfato sintasa (proteína involucrada en la biosíntesis de la pared celular). Pese a que TnsD se une a una secuencia dentro de *glmS*, dirige al core TnsABC para que reconozca un sitio a 25 pb posterior al terminador de *glmS*. Es decir, al integrarse el Tn7 en el cromosoma no interrumpe el gen *glmS* (**Fig. 3**). Si bien no se conocen las

causas de la elección de este sitio por parte del Tn7, es importante señalar que se trata de un gen altamente conservado entre las bacterias. Esta inserción no compromete la viabilidad de la bacteria, permitiendo así una coexistencia entre el Tn7 y su hospedero y asegurando el Tn7 su transferencia vertical (Wolkow et al., 1996; Peters & Craig, 2001).

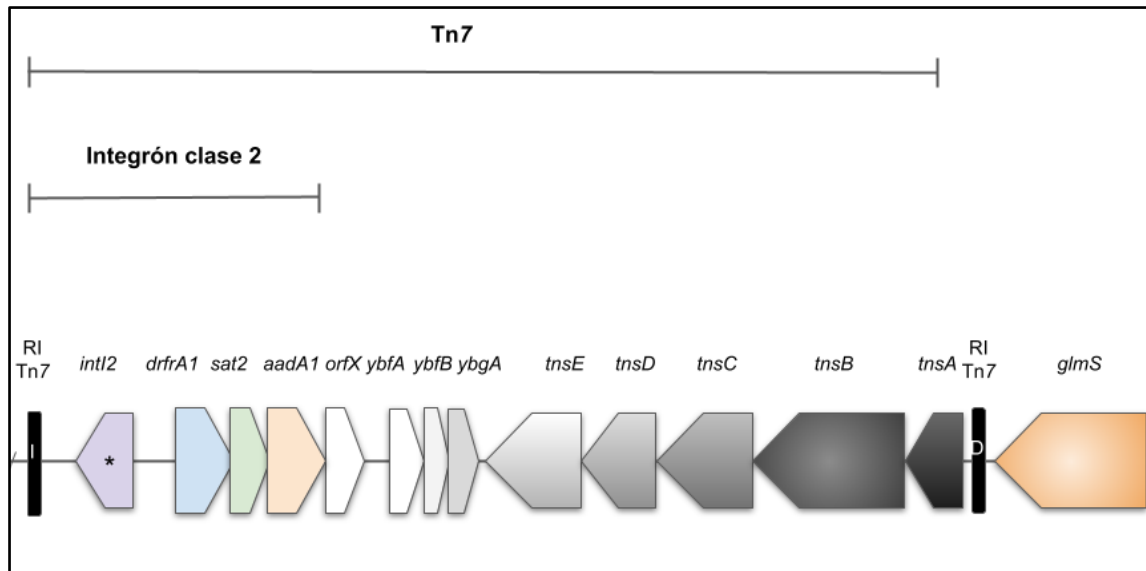


Fig. 3. Transposón Tn7, portador de un *Int2*, insertado en su sitio cromosómico, *attTn7*, en *E. coli*. Se indica a la derecha el gen cromosomal *glmS*. Con flechas gruesas se indica el sentido de los genes. RI, repetidos invertidos imperfectos del Tn7.

En el laboratorio se han realizado análisis fenotípicos y genotípicos de una colección de 230 aislamientos de *E. coli* uropatógeno (UPEC). Los mismos comprendieron estudios de virulencia, resistencia antibiótica y de presencia de *Int1* y *2*. Se detectó el gen para la integrasa, *intI1* e *intI2*, en el 22% (50 cepas) y 8% (19 cepas) de los aislamientos, respectivamente (Poey et al., 2012; Poey & Laviña, 2014). Se hicieron experimentos de transferencia horizontal, por conjugación y transducción, del *Int1* entre cepas de *E. coli*. Es así que se generó una colección de 19 cepas de *E. coli* K12 *Int1*⁺ (18 cepas obtenidas por conjugación y una por transducción P1). Los transconjugantes fueron seleccionados con los antibióticos ampicilina (AMP), tetraciclina (TET), STR y SMX (Poey & Laviña, 2018).

En 18 de las cepas, el integrón estaba en plásmidos conjugativos que, además, contenían otros genes de resistencia. Invariablemente, estos plásmidos albergaban al menos un gen de resistencia a sulfametoxazol (sulfamida), que podía ser *sul1*, de la plataforma del integrón, *sul2*, independiente del *Int1*, o *sul3*, un gen poco usual. Otras resistencias frecuentemente transferidas con el *Int1* fueron a AMP, codificada fuera del *Int1*, y a STR

y TMP, generalmente codificadas por la región variable del Int1 (Poey & Laviña, 2014; Poey & Laviña, 2018). Cabe señalar que de los 19 aislamientos de UPEC *intI2*⁺, cuatro fueron también positivos para *intI1* y 14 para *sul2*.

En este trabajo se plantea estudiar la localización, cromosómica o plasmídica, del Int2 en la colección de cepas de UPEC Int2⁺ y su transferencia horizontal a cepas de *E. coli* K12.

II. OBJETIVOS

II.1) Objetivo General

Analizar la localización genómica y la transferencia horizontal de integrones de clase 2 en cepas de *E. coli*.

II.2) Objetivos específicos

- 1) Analizar *in silico* la distribución y localización del Tn7 (portador del Int2) en los bancos de datos.
- 2) Corroborar genotípicamente (detección PCR de los genes *intI2* y *dfrA1*) y fenotípicamente (resistencias antibióticas) la presencia del Int2 en los 18 aislamientos de la colección de cepas de UPEC.
- 3) Determinar por PCR la localización cromosómica del Tn7 en su sitio *attTn7* en la colección de cepas de UPEC Int2⁺.
- 4) Hacer conjugaciones entre las cepas de UPEC Int2⁺ como donantes y una cepa de *E. coli* K12 como receptora para analizar la posible movilidad horizontal del Tn7.
- 5) Analizar genotípica y fenotípicamente las cepas de *E. coli* transconjugantes que recibieron el Tn7, incluyendo la posible localización cromosómica del mismo en el sitio *attTn7* (1^{as} conjugaciones).
- 6) Realizar una segunda serie de conjugaciones entre las cepas de *E. coli* transconjugantes que recibieron el Tn7 y otra cepa receptora de *E. coli* K12 (2^{das} conjugaciones). Efectuar las mismas determinaciones que en el item anterior.
- 7) Analizar globalmente los resultados obtenidos.

III. MATERIALES & MÉTODOS

III.1) Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

De la colección de 19 cepas de UPEC portadoras del Int2 del laboratorio se emplearon 18 debido a que un aislamiento no fue viable (**Anexo 1**). De éstas, cuatro presentaron además el Int1. Dichas cepas pertenecían a una colección de 230 cepas de UPEC del laboratorio, 112 cepas procedentes de aislamientos de mujeres embarazadas (E) y 118 de niños con anomalías anatómicas o funcionales en el tracto urinario (P). Estos aislamientos se obtuvieron entre 2007 y 2009 del Centro Hospitalario Pereira Rossell, siguiendo un diseño epidemiológico. Los aislamientos fueron analizados para su filogenia, virulencia, resistencia antibiótica, presencia de genes *sul1*, 2 y 3 e integrasas *intI1* y 2. De los 18 aislamientos de UPEC Int2⁺, siete procedían de mujeres embarazadas y 11 de niños (Poey et. al., 2012; Poey & Laviña, 2014; Poey & Laviña, 2018).

Se usaron como receptoras en los experimentos de conjugación dos cepas derivadas de *E. coli* K12: BZB1011 Δ *hsdR::kan* y W3110 *srl::Tn10*. La primera es un mutante espontáneo *gyrA* de W3110, deficiente para el sistema de restricción por tener la mutación *hsdR748:kan*, y ser resistente a los antibióticos ácido nalidíxico (NAL) y kanamicina (KAN), mientras que la segunda es un mutante resistente al antibiótico tetraciclina (TET) por tener la mutación *srl::Tn10* (Poey & Laviña, 2018).

Las cepas se cultivaron en medio nutriente Luria Bertani (LB) a 37°C. Para analizar la susceptibilidad a los distintos antibióticos, los mismos se adicionaron al medio de LB en las siguientes concentraciones finales: TMP (100 µg/ml), SMX (500 µg/ml), SXT (100 µg/ml TMP y 500 µg/ml SMX), ampicilina (AMP, 100 µg/ml), cloranfenicol (CHL, 60 µg/ml), KAN (30 µg/ml), NAL (40 µg/ml), TET (15 µg/ml), estreptomicina alta (STR_H, 100 µg/ml), estreptomicina baja (STR_L, 10 µg/ml).

III.2) Análisis *in silico* de la localización del Tn7

Se analizó la localización del Tn7 en el banco de datos NCBI usando el programa Nucleotide Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se empleó como referencia para dicho análisis la secuencia del transposón Tn7 de 14067 pb, que incluye sus repetidos invertidos imperfectos, portada por la cepa de *E. coli* AH01 (número de acceso NZ_CP055251.1). La secuencia del Tn7 de esta cepa es conservada.

III.3) Análisis genotípicos

III.3.1) Determinación de la presencia de *Int1*, *Int2* y *sul2*, y de la localización del Tn7

Se determinó la presencia de los genes *intI1*, *intI2*, *dfrA1*, *sul1*, *sul2* y la localización cromosómica del Tn7 mediante la técnica de PCR, usando cebadores previamente diseñados y, para el caso de la localización del Tn7, algunos cebadores de diseño propio (Poey & Laviña, 2014; Poey & Laviña, 2018; Alonso et al., 2018; Aznárez, 2020) (**Tabla 1**). Para estudiar la presencia cromosómica del transposón se usó la pareja de cebadores, TN75R-*glmS* (para amplificar la zona derecha del Tn7 integrado a 25 pb de *glmS*, sitio *attTn7*), y las parejas de cebadores Tn75'-*fimF* y Tn75'-*pstF* (para amplificar la zona izquierda del Tn7 integrado al cromosoma) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR

Fragmento amplificado (pb)	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Temp. de hibr. (°C)	Referencia
<i>intI1</i> (473)	HS463a	CTGGATTTCGATCACGGCACG	66	59	Chowdhury et al. (2011)
	HS464	ACATGCGTGTAATCATCGTCG	64		
<i>intI2</i> (787)	HS501	CACGGATATGCGACAAAAGGT	55,8	50	Poey & Laviña (2014)
	HS502	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	54,3		
<i>sul1</i> (840)	<i>sul1F</i>	ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTG	67	54	Poey & Laviña (2018)
	<i>sul1R</i>	CTAGGCATGATCTAACCTCGG	64		
<i>sul2</i> (727)	<i>sul2F</i>	TTTCGGCATCGTCAACATAA	54,3	50	Trobos et al. (2009)
	<i>sul2R</i>	GTGTGTGCGGATGAAGTCAG	60,5		
<i>dfrA1</i> (283)	<i>dfrA1F</i>	CACGTTCAAGTTTACATCTGAC	59,3	55	Aznárez (2020)
	<i>dfrA1R</i>	CCCTTTTGCCAGATTGGTAACTAT	62,5		
Extremo 3' de Tn7/ <i>glmS</i> (534)	Tn75R	GACTCGTCCCGTCTTATGAG	59,2	56 y 54	Alonso et al. (2018)
	<i>glmS</i>	GGCGGTCAGTTGTATGTCTT	60		
Extremo 5' de Tn7	Tn75'	GACGCTACACCCAGTCCCATCT	66,2	62	Este trabajo
<i>fim</i> (481)	<i>fimF</i>	CACCGACGAAGTGAACAACACCA	64,6		
<i>pstS</i> (494)	<i>pstF</i>	CCTGCACCTGTCAGGCTTGCTT	67		

Los moldes de ADN para los PCR se obtuvieron por el método de lisado por calor. Las amplificaciones fueron realizadas a un volumen final de 30 µL, conteniendo buffer 1X, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 500 nM de cada primer y 0.75 U de la enzima Dream-taq polimerasa o, en caso de las enzimas High-taq (Bioron) y DFS-taq (Bioron), 2 U. El protocolo de amplificación empleado fue: 1-2 min a 94-95°C, seguido por 30 s de 94-95°C (30 ciclos), 30 s de annealing a la temperatura indicada para cada fragmento, 1 min de extensión a 72°C y, por último, una extensión final de 2-5 min a 72°C. Los fragmentos amplificados se visualizaron a través de electroforesis de geles de agarosa de entre 1-2%, según su tamaño. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron

mediante radiación UV. En la **Tabla 1** se indican los cebadores empleados, las temperaturas de hibridación, así como el tamaño de los fragmentos amplificados.

III.4) Análisis fenotípicos de resistencia antibiótica

Se estriaron las cepas en medios de LB con los antibióticos incorporados a las concentraciones previamente indicadas. Una cepa se consideró resistente si fue capaz de crecer formando una estría completa con crecimiento confluyente y colonias aisladas. Se consideró sensible cuando la cepa no generó estría. Es importante señalar que, para los antibióticos SMX y TMP, la distinción entre cepas sensibles y resistentes no fue absoluta. Las cepas sensibles evidenciaron un crecimiento basal tenue, denominado “*leaky*”. En las placas con SXT la diferencia entre clones sensibles y resistentes fue bien clara, entre no crecimiento y crecimiento, respectivamente (Poey & Laviña, 2018; Poey et al., 2019). Las placas se incubaron durante 24 hs a 37°C.

III.5) Conjugaciones

Se realizaron conjugaciones mediante el procedimiento de “cross streaking” en placas de LB adicionadas con TMP (para la selección) y con KAN, NAL o TET (para la contraselección). En los primeros experimentos de conjugación se usaron como donantes las 17 cepas de UPEC Int2⁺ TMP^R, NAL^S y KAN^S y como receptora la cepa de *E. coli* K12 BZB1011 Δ hsdR::kan que es TMP^S, NAL^R y KAN^R. Cabe mencionar que el aislamiento 18P no fue ensayado debido a que era TMP^S. En los segundos experimentos de conjugación se utilizaron como donantes los transconjugantes de *E. coli* K12 contexto BZB1011 Δ hsdR::kan Int2⁺ TMP^R y como receptora la cepa de *E. coli* K12 W3110 srl::Tn10, que era TMP^S y TET^R. El procedimiento consistió en realizar una siembra en listones de una suspensión en LB de la cepa receptora y estriar perpendicularmente las cepas donantes en placas de LB con los antibióticos para la selección y la contraselección incorporados. Se incubaron las placas durante 24 hs. a 37°C. Se esperaba crecimiento, i.e. presencia de transconjugantes TMP^R en la zona de intersección de donantes con receptora. En las zonas por fuera de la intersección no se debía observar crecimiento ya que los donantes son inhibidos por el antibiótico de la contraselección y la receptora por el antibiótico de la selección. En aquellos cruces donde se observó transconjugantes se procedió a purificar éstos en el mismo medio de selección para continuar con los análisis fenotípicos y genotípicos.

IV. RESULTADOS

IV.1) Análisis *in silico* de la distribución y de la localización del Tn7

Como se indicó en la Introducción, el integrón de clase 2 estaría portado por el Tn7. Dicho transposón se inserta a 25 pb del codón de terminación de *glmS* en el cromosoma de *E. coli* (sitio *attTn7*). Los estudios *in silico* realizados en este trabajo indicaron que *E. coli* presenta dos posibles loci “downstream” de *glmS*: *fim*, que codifica para una chaperona fimbrial, o *pstS*, que interviene en la captación de fosfato.

En este trabajo se estudió, en una primera instancia, la distribución *in silico* del Tn7. Para ello se utilizó el programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), empleando la secuencia del Tn7, portador de un Int2, perteneciente a la cepa *E. coli* AH01 (número de acceso NZ_CP055251.1) (**Anexo 2**). Se acotó su búsqueda a 500 secuencias con una identidad del 95% y una cobertura del 100%. Este análisis indicó, a la fecha de 12-09-23, que el Tn7 se encuentra en las Gammaproteobacterias, siendo Enterobacteriaceae la familia en la que predomina, seguida de Morganellaceae y de Moraxellaceae. Posteriormente, se restringió el análisis de la distribución del Tn7 a la especie *E. coli* con 100% en identidad y cobertura de secuencia (**Fig. 4, Anexo 3**). Es así que se obtuvieron 39 secuencias, de las cuales 31 estaban en replicones totalmente secuenciados: 29 en cromosoma y dos en plásmidos. Dichos plásmidos correspondieron a pEcoUTI1f (de 109478 pb) y a pR721 (de 75581 pb). Para el plásmido pEcoUTI1f también estaba secuenciado el genoma completo de la cepa (*E. coli* UPEC 245U/190328) que lo portaba. En esta última se constató una copia adicional cromosómica de Tn7, pero deletada. En el cromosoma de las 29 cepas, el Tn7 se localizó en su sitio de integración *attTn7*. De éstas, 21 cepas presentaron el locus *pstS* a la izquierda de su sitio de inserción, mientras que ocho tuvieron el locus *fim*. En lo referente a los dos plásmidos portadores del Tn7, ambos fueron *intI1⁺* y *sul1⁻*, y el Tn7 se localizó en sitios diferentes en ambos plásmidos. Además, pEcoUTI1f presentó *sul2* (**Fig. 4, Anexo 3**).

Paralelamente a lo anterior, se hizo un Blast de la secuencia del Int2, tomando como referencia la secuencia perteneciente a la cepa *E. coli* AH01, con el objetivo de corroborar la ausencia del Int2 por fuera del Tn7. En este caso, el análisis se limitó a aquellas secuencias que tuvieran 100% de identidad y de cobertura en *E. coli*. Es así que se obtuvieron 65 secuencias del Int2. Se comprobó que 54 de las mismas estaban portadas por secuencias del Tn7 con un mínimo de 95% de identidad y de cobertura con el Tn7 de referencia, de la cepa *E. coli* AH01. De estas 54 secuencias, 48 fueron cromosómicas, dos

plasmídicas (pEcoUTI1f y pR721), tres secuencias de anotación parcial (de entorno genético desconocido) y una presente en una isla genómica de localización incierta. En lo referente a las 11 secuencias restantes, 10 evidenciaron restos de secuencias del Tn7, con cobertura entre 30 al 73%. De estas 10, nueve fueron de localización plasmídica y una cromosómica. Cabe mencionar que esta última corresponde a la secuencia presentada por la cepa *E. coli* UPEC 245U/190328, portadora además de una copia completa del Tn7 en el plásmido pEcoUTI1f. La otra secuencia corresponde a una anotación parcial sólo de Int2 perteneciente a un plásmido (**Fig. 4, Anexo 4**).

A partir de estos resultados *in silico* el Int2 no se localizaría por fuera del Tn7.

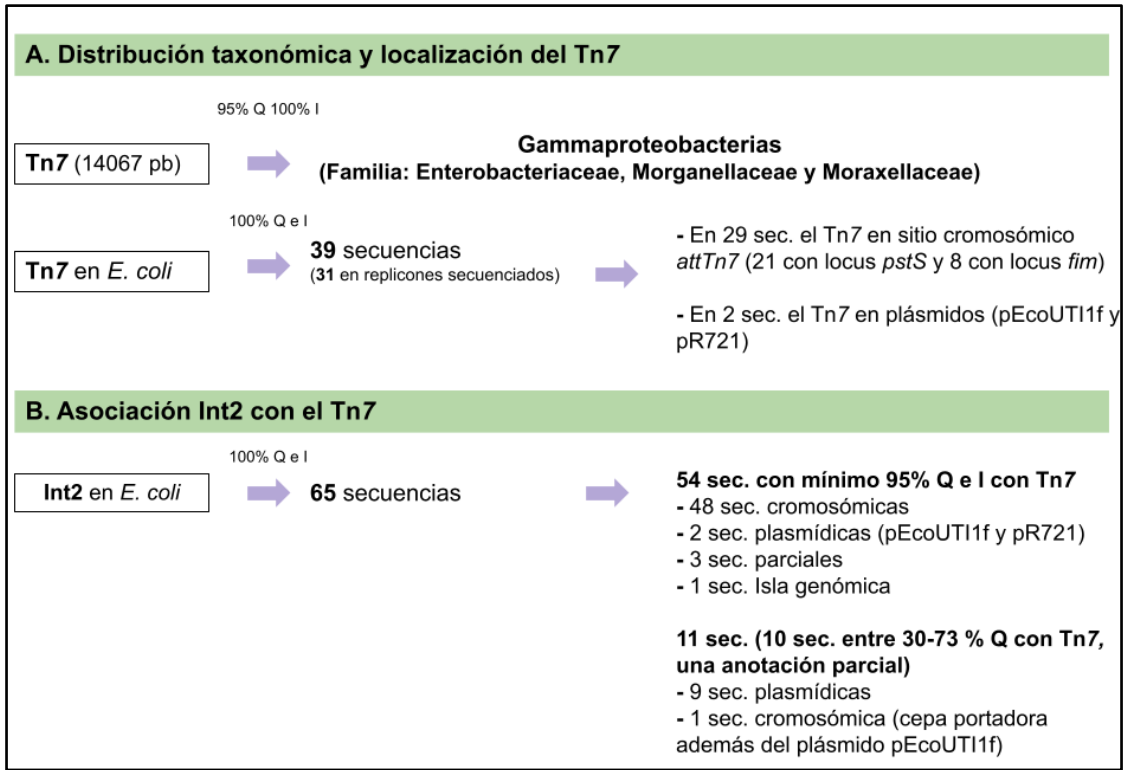


Fig 4. Representación esquemática de la distribución y localización del **A)** Tn7 y del **B)** Int2 en asociación con el Tn7. Se indican los porcentajes de cobertura (Q) y de identidad (I) de secuencia con los que se acotó el análisis del Blast.

IV.2) Análisis genotípicos y fenotípicos de las cepas de UPEC Int2⁺

IV.2.1) Determinación de la presencia del Int2

Como se indicó en Materiales & Métodos, se confirmó la presencia del Int2 en las cepas de UPEC Int2⁺ mediante la amplificación del gen que codifica para su integrasa, *intI2* y del gen *dfrA1*, que confiere resistencia a trimetoprim. Se corroboró que todas las cepas de la colección de UPEC analizadas presentaron los genes *intI2* y *dfrA1*, a excepción de la cepa 18P, que careció del gen *dfrA1*, como era de esperar, pues era sensible a TMP (Fig. 5).

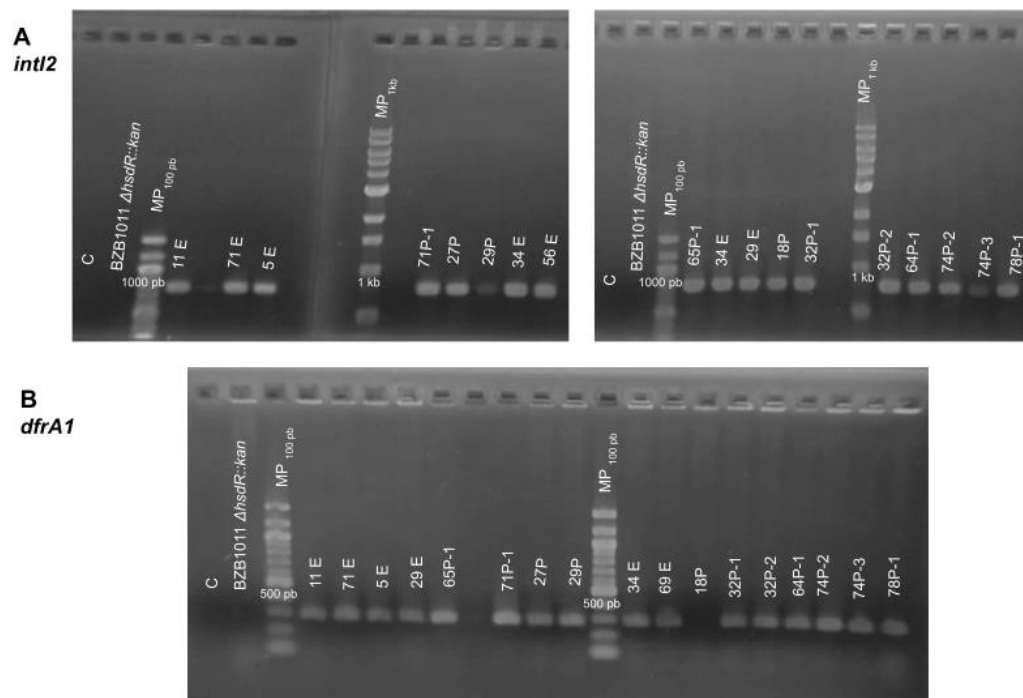


Fig 5. Detección de la presencia de Int2 en la colección de cepas de UPEC Int2⁺. Geles de agarosa de 1% en A y de 2% en B. **A)** *intI2* (787 pb), **B)** *dfrA1* (283 pb). C, control de la reacción de amplificación; MP, marcador de peso molecular de 100 pb y 1 kb, Biolabs. Con letras y números se indican los aislamientos de la colección. E, aislamientos procedentes de mujeres embarazadas; P, aislamientos pediátricos. BZB1011 Δ *hsdR::kan*, cepa de *E. coli* K12. No se muestran las amplificaciones correspondientes a *intI2* y *dfrA1* de las cepas 69E y 56E, respectivamente.

IV.2.2) Análisis fenotípicos de la resistencia antibiótica

En cuanto a la caracterización fenotípica de las cepas de UPEC, se corroboró que las resistencias antibióticas estudiadas dieron los mismos resultados que los descritos anteriormente, excepto el aislamiento 5E, que perdió su resistencia a SMX (Poey et al., 2012). Los aislamientos evidenciaron varias resistencias antibióticas, en su mayoría a tres o más antibióticos pertenecientes a distintas familias (**Tabla 2**). En los 18 aislamientos se observaron los siguientes porcentajes de resistencias: 94% STR^R y TMP^R, 83% SMX^R y SXT^R, 78% AMP^R, 61% TET^R, 44% NAL^R, 33% CHL^R y 6% KAN^R. Los aislamientos

5E y 29E fueron resistentes a TMP pero no a SMX y, por ende, tampoco a SXT. Cabe destacar que los porcentajes de resistencias, para todos los antibióticos analizados, fueron mayores en los aislamientos procedentes de pacientes pediátricos con respecto a los provenientes de mujeres embarazadas. En los aislamientos procedentes de ambos grupos las resistencias que predominaron fueron las correspondientes a STR (100% en P y 86% en E), TMP (91% en P y 100% en E), SMX (91% en P y 71% en E) y SXT (91% en P y 71% en E).

Tabla 2. Resistencias antibióticas de la colección de cepas de UPEC Int2⁺

Cepa	Resistencia antibiótica
UPEC	
11E	AMP, CHL, STR _L , TMP, SMX, SXT
71E	AMP, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
5E	AMP, NAL, TMP
29E	STR _L (leaky), TMP
65P-1	AMP, NAL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
71P-1	AMP, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
27P	AMP, NAL, CHL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
29P	AMP, NAL, CHL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
34E	AMP, NAL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
56E	STR _L , TMP, SMX, SXT
69E	STR _L , TMP, SMX, SXT
18P	NAL, STR _L , TMP (leaky)
32P-1	AMP, CHL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
32P-2	AMP, CHL, TET, KAN, STR _L , TMP, SMX, SXT
64P-1	AMP, CHL, STR _L (leaky), TMP, SMX (leaky), SXT
74P-2	AMP, NAL, TET, STR _L (leaky), TMP, SMX, SXT
74P-3	AMP, NAL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
78P-1	AMP, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT
*AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; NAL, ácido nalidíxico; KAN, kanamicina; TET, tetraciclina; STR _H , estreptomicina alta; STR _L , estreptomicina baja; TMP, trimetoprim; SMX, sulfametoxazol; SXT, cotrimoxazol; E, aislamientos procedentes de mujeres embarazadas; P, aislamientos procedentes de niños.	

IV.2.3) Localización cromosómica del Tn7 en las cepas de la colección de UPEC Int2⁺

Una vez determinada la presencia del Int2, se procedió a estudiar la localización cromosómica del Tn7 en las 18 cepas de la colección de UPEC. Debido a que se encontraron dos variantes contiguas al extremo izquierdo del Tn7, se diseñaron dos cebadores para amplificar los dos tipos de unión, uno desde *fim* y otro desde *pstS*. De esta forma, se analizó por PCR la inserción del Tn7 en el sitio cromosómico *attTn7* para sus dos extremos. Para el extremo izquierdo, se usaron dos parejas de cebadores: *fimF* y Tn75' (unión Tn7-*fim*), y *pstF* y Tn75' (unión Tn7-*pstS*). Para el extremo derecho, se usó la pareja Tn75R y *glmS* (**Fig. 6**).

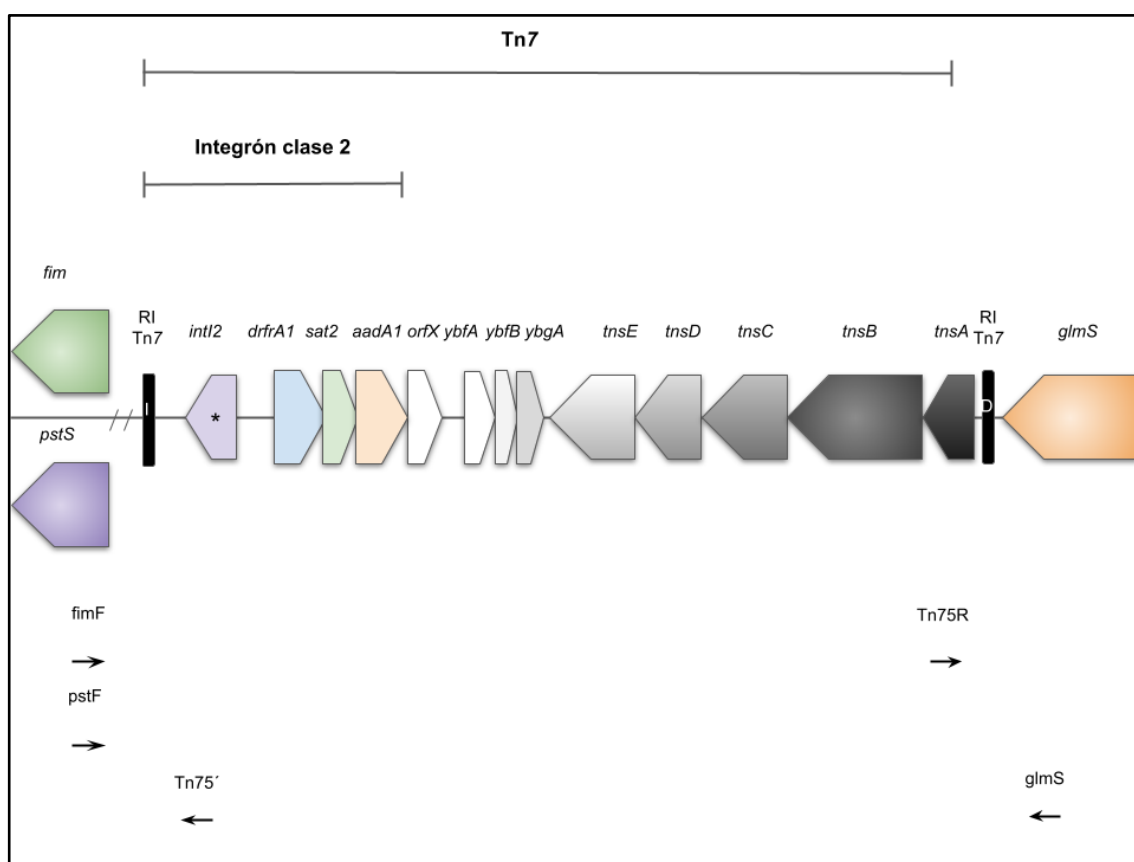


Fig. 6. Transposón Tn7, portador de un Int2, insertado en su sitio cromosómico, *attTn7*, en *E. coli*. Se indican los dos posibles loci cromosomales, *fim* y *pstS*, localizados a la izquierda del transposón. A la derecha, el gen cromosomal *glmS*. Con flechas gruesas se indica el sentido de los genes. Con flechas finas, cebadores empleados en el trabajo y su dirección. RI, repetidos invertidos imperfectos del Tn7.

En 13 de las cepas el Tn7 se localizó en su sitio cromosómico *attTn7* ya que se obtuvieron bandas de amplificación del tamaño esperado para ambos extremos del Tn7. En el extremo derecho hubo amplificación en las 15, aunque en dos aislamientos, 32P-1 y 32P-2, tuvo un tamaño por encima del esperado (**Fig. 7A**). En cuanto al extremo izquierdo del Tn7 insertado en el cromosoma, se observó que 11 presentaron el locus *pstS* (**Fig. 7B**).

Es importante destacar que los aislamientos 32P-1 y 32P-2 dieron bandas por debajo del tamaño esperado para el locus *pstS*. Es de pensar que en estas dos últimas cepas el Tn7 no se insertó en su sitio *attTn7* sino a unas pares de bases del mismo. Por otro lado, sólo dos aislamientos, 64P-1 y 78P-1, presentaron el locus *fim* a la izquierda del Tn7 insertado (**Fig. 7C**).

Los aislamientos 71E, 27P y 29P no amplificaron con ninguna de las dos parejas de cebadores, por lo que serían candidatos a tener el Tn7 en un plásmido (**Fig. 7**).

Según estos análisis, el Tn7 se localizó en su sitio *attTn7* cromosómico o próximo a él en 15 de las cepas de UPEC, predominando en las cepas el locus *pstS* a la izquierda de su sitio de inserción. En estas cepas desconocemos si el Tn7 pueda presentar además una localización plasmídica. En las tres cepas restantes de la colección, 71E, 27P y 29P, el Tn7 tendría una localización plasmídica (**Fig. 7**).

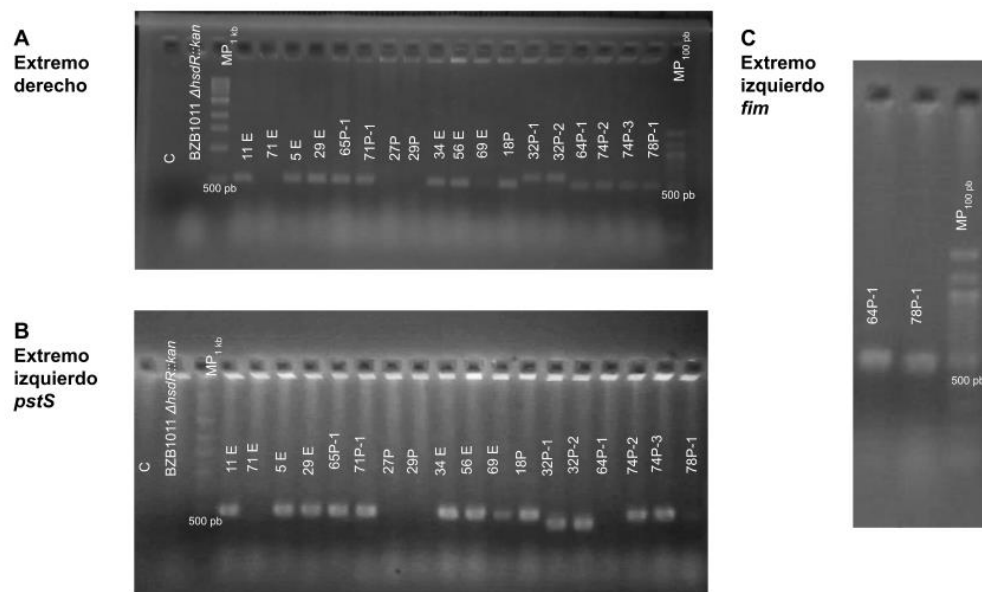


Fig 7. Localización cromosómica del Tn7 en las cepas de la colección de UPEC. Geles de agarosa 2%. **A)** Amplificación del extremo derecho del Tn7 integrado en su sitio cromosómico en *E. coli*, *attTn7* (fragmento Tn75R-glmS de 534 pb), **B)** y **C)** Amplificación de extremo izquierdo del Tn7 integrado en el cromosoma de *E. coli*. **B)** Amplificaciones con el locus *pstS* (fragmento Tn75'- *pstF* de 494 pb); **C)** Amplificaciones con el locus *fim* (fragmento Tn75'- *fimF* de 481 pb). C, control de reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb HyperLadder y 1 kb Biolabs.

IV.3) Conjugaciones de cepas de UPEC Int2⁺ con la cepa de *E. coli* K12 BZB1011 Δ hsdR::kan (1^{era} etapa de conjugación)

Se estudió la transferencia del Int2, y por ende del Tn7, por conjugación, seleccionando con TMP y contraseleccionando con NAL o con KAN, según los experimentos. De las 17 conjugaciones realizadas (no se ensayó el aislamiento 18P por ser TMP^S) se obtuvieron transconjugantes TMP^R en cuatro de ellas. Estas conjugaciones fueron las que tuvieron como donantes los aislamientos de UPEC Int2⁺, 71E, 27P, 29P y 65P-1 (Fig. 8). Algunos de los transconjugantes fueron purificados, en el mismo medio de selección, para sus posteriores análisis fenotípicos y genotípicos.

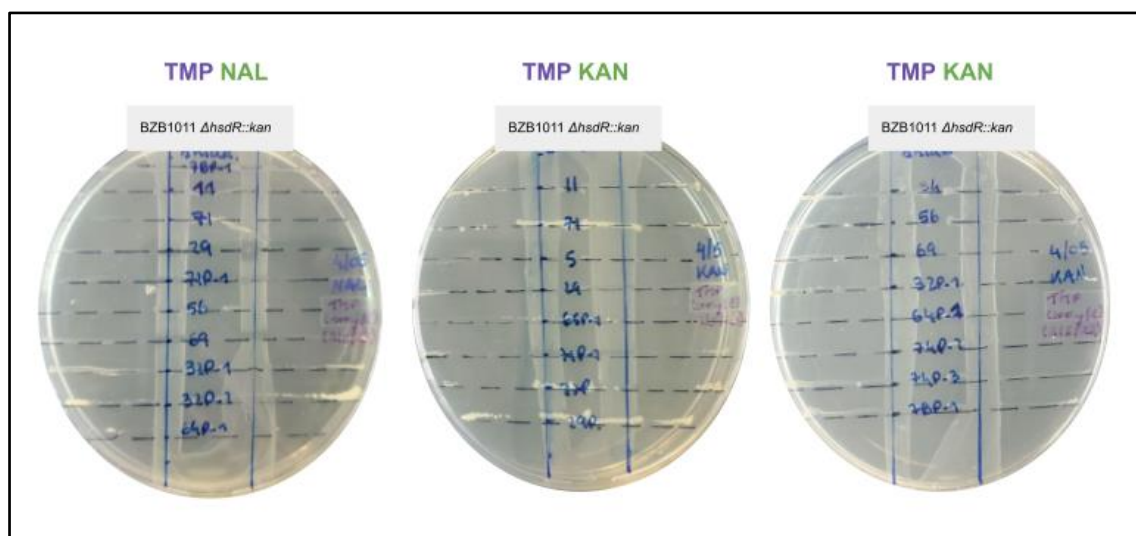


Fig 8. Experimentos de conjugación. Cepas de la colección de UPEC Int2⁺ x BZB1011 Δ hsdR::kan. Arriba de cada placa se indican los antibióticos usados para la selección (violeta) y para la contraselección (verde) así como la cepa receptora de *E. coli* K12 usada en el listón. Con número, cepas donantes.

IV.3.1) Análisis de la presencia de *intI2* en los transconjugantes de contexto BZB1011 Δ hsdR::kan TMP^R

En todos los transconjugantes BZB1011 Δ hsdR::kan TMP^R analizados, excepto BZB1011 Δ hsdR::kan (p71E) clon N°1, se amplificó el gen *intI2*. Es decir, se transfirió el Int2 en la amplia mayoría de los transconjugantes BZB1011 Δ hsdR::kan TMP^R (Fig. 9).

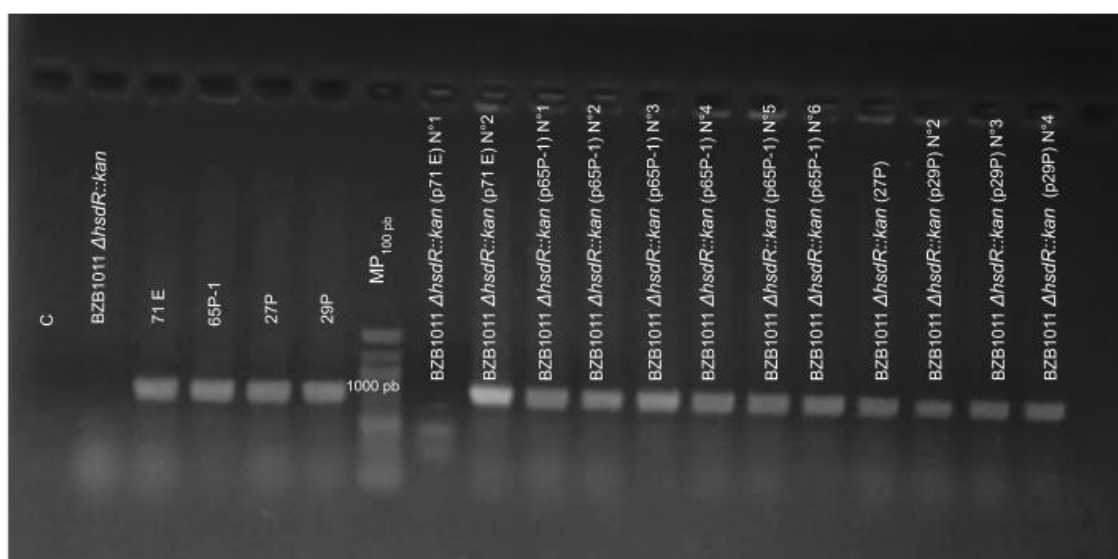


Fig 9. Detección de *intI2* en los transconjugantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan* TMP^R. Gel de agarosa de 1%. Fragmento amplificado *intI2* (787 pb). C, control de la reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb y 1 kb Biolabs. 71E, 65P-1, 27P y 29P, cepas de UPEC usadas como donantes en las conjugaciones. BZB1011 *ΔhsdR::kan*, cepa de *E. coli* K12 empleada como receptora en los experimentos.

IV.3.2) Localización del Tn7 en los transconjugantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan* TMP^R Int2⁺

Se estudió la presencia del Tn7 en su sitio cromosómico, *attTn7*, en los transconjugantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan* TMP^R Int2⁺ mediante la estrategia de PCR empleada previamente. Es importante señalar que en esta etapa no se hizo la reacción con los primers Tn75'- fimF, del extremo izquierdo de Tn7 insertado en el cromosoma, debido a que la cepa receptora BZB1011 *ΔhsdR::kan* posee el locus *pstS* y no el *fim* antes de su sitio de inserción.

Sólo los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1) presentaron el Tn7 en su sitio cromosómico ya que amplificaron con el locus *pstS* a la izquierda y con el locus *glmS* a la derecha, revelando así la inserción del Tn7 en su *attTn7*. En el resto de los transconjugantes, es decir, BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p71E), BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P), el Tn7 sería de localización plasmídica ya que no se observó banda de amplificación. Para los distintos clones analizados de cada conjugación se observaron los mismos resultados (**Fig. 10**). Es importante señalar que tanto la cepa de UPEC 65P-1 como los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1) presentaron el Tn7 en su sitio cromosómico, *attTn7*. Sin embargo, la cepa 65P-1 debe tener otra copia del Tn7 de localización plasmídica. Dicho plásmido, portador del Tn7, fue transferido por

conjugación a BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ y, una vez en dicha cepa, se deduce que el transposón saltó a su sitio cromosómico. En esta instancia no podemos confirmar si se mantuvo la copia plasmídica del Tn7 (ver más adelante).

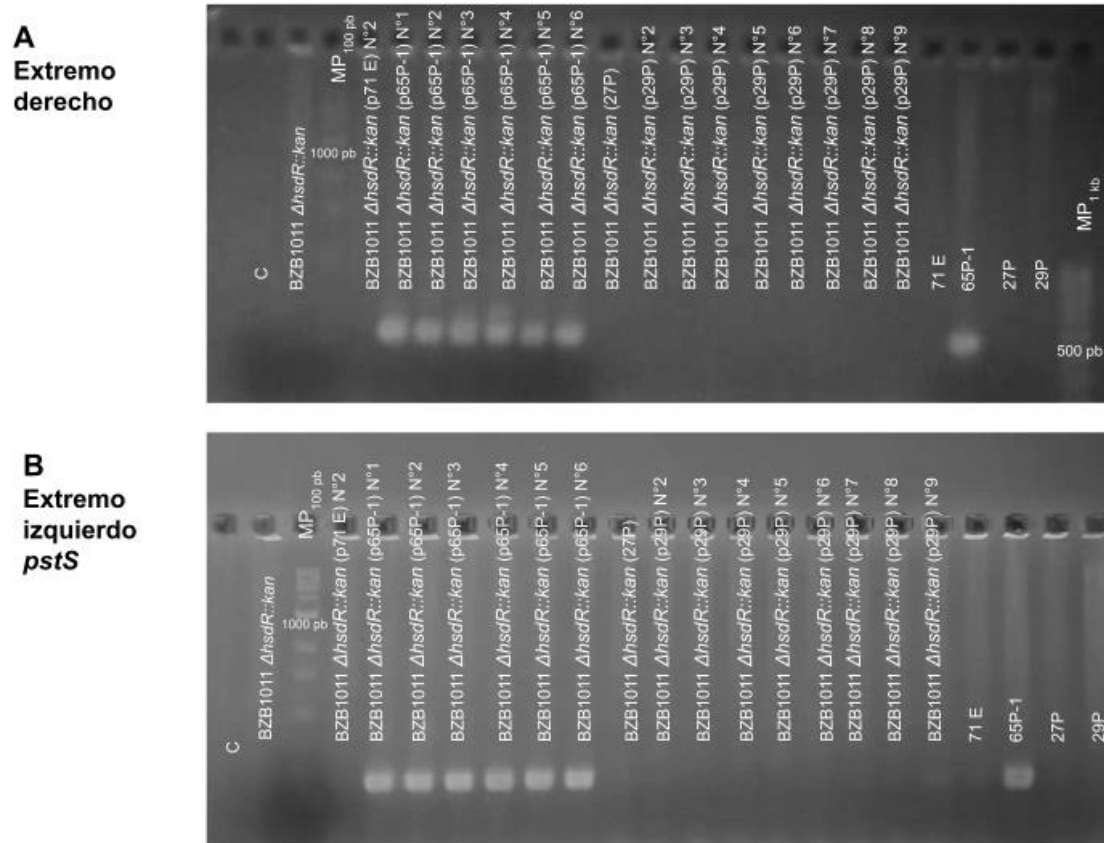


Fig 10. Localización cromosómica del Tn7 en los transconjugantes de contexto BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ Int2⁺. Geles de agarosa 2 %. **A)** Amplificación del extremo derecho del Tn7 integrado en su sitio cromosómico en *E. coli*, attTn7 (fragmento Tn75-glmS de 534 pb), **B)** Amplificación del extremo izquierdo del Tn7 insertado en el cromosoma de *E. coli* desde el locus *pstS* (fragmento Tn75'-pstF de 494 pb). C, control de reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb HyperLadder y 1 kb Biolabs. 71E, 65P-1, 27P y 29P, cepas de UPEC usadas como donantes en las conjugaciones. BZB1011 $\Delta hsdR::kan$, cepa de *E. coli* K12 empleada como receptora en los experimentos.

IV.3.3) Análisis de la presencia del Int1 y de *sul2* en los transconjugantes BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ TMP^R Int2⁺

De las cepas donantes de UPEC de los cuales se logró aislar transconjugantes TMP^R Int2⁺, tres de ellas, 71E, 27P y 29P, tenían además el Int1. Cabe señalar que 27P y 29P eran portadoras de *intI1* pero carentes de *sul1* (Poey & Laviña, 2018). Con el fin de analizar si conjuntamente con la transferencia del Int2 se pasó también el Int1 es que se estudió en estos tres transconjugantes, la presencia de *intI1* y de *sul1*. Ninguno de los transconjugantes TMP^R Int2⁺ recibió paralelamente el Int1, i.e. todos carecían de *intI1* y de *sul1* (Fig. 11 A y B). Cabe destacar que el transconjugante BZB1011 $\Delta hsdR::kan$

(p71E) clon N°1 recibió solo el Int1, fue *intI1*⁺ y *sul1*⁺, mientras que el transconjugante BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p71E) clon N°2, recibió sólo el Int2. Posteriormente, se analizó si los transconjugantes TMP^R Int2⁺ adquirieron también el gen *sul2* ya que las cepas de UPEC empleadas como donantes eran *sul2*⁺. Se confirmó que en todos los casos en los que se transfirió el Int2, éste fue acompañado del gen *sul2*, excepto para los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1), los cuales fueron *sul2*⁻. Cabe mencionar que el transconjugante portador sólo del Int1, BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p71E) clon N°1, fue *sul2*⁻ (**Fig. 11C**).

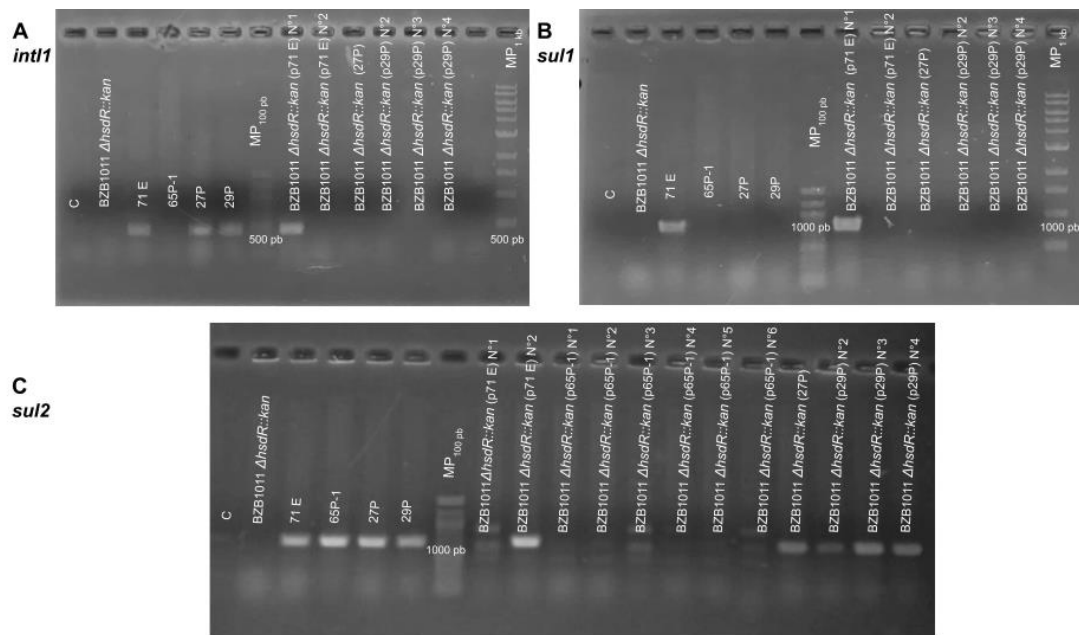


Fig 11. Detección de la presencia de Int1 y de *sul2* en los transconjugantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan*. Geles de agarosa de 1%. **A)** *intI1* (473 pb), **B)** *sul1* (840 pb), **C)** *sul2* (727 pb). C, control de reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb y 1 kb Biolabs. 71E, 65P-1, 27P y 29P, cepas de UPEC usadas como donantes en las conjugaciones. BZB1011 *ΔhsdR::kan*, cepa de *E. coli* K12 empleada como receptora en los experimentos.

IV.3.4) Análisis fenotípicos de los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* TMP^R Int2⁺

Se analizó el fenotipo de resistencia antibiótica de los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* TMP^R Int2⁺ con el objetivo de conocer las resistencias cotransferidas junto con el Int2. Para ello, se estudió la resistencia a AMP, CHL, TET, STR, SMX y SXT (**Fig. 12**). En cuanto a los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p71E), el clon N°2 portador del Int2⁺ adquirió todas las resistencias presentes en la cepa donante, mientras que el clon N°1 Int1⁺ fue resistente a los mismos antibióticos, excepto a TET. Los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1) solo adquirieron las resistencias

codificadas por el Int2, es decir fueron STR_L^R y TMP^R. Cabe recordar que la cepa 65P-1 carecía de *sul1* y que el gen *sul2* no fue transferido junto con el Int2, por lo que era de esperar que los transconjugantes fueran SMX^S y SXT^S (Tabla 3, Fig. 12).

Por último, los transconjugantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P) adquirieron la CHL^R, STR^R, TMP^R, SMX^R y SXT^R i.e. en ninguno de los transconjugantes la resistencia AMP y TET fue transferida junto con el Int2 (Tabla 3, Fig. 12).

Tabla 3. Resistencias antibióticas de los transconjugantes obtenidos

Cepa donante/ Resistencia antibiótica	Transconjugantes/ Resistencia antibiótica	
	Contexto BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i>	Contexto W3110
71E AMP, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT	BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (p71E) N° 1 (Int1⁺) AMP, STR _L , TMP, SMX, SXT	n.a.
	BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (p71E) N° 2 (Int2⁺) AMP, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT	n.a.
65P-1 AMP, NAL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT	BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (p65-P1) N° 1 al 6 TMP, STR _L	W3110 (p65-P1) N°2 clones 1 al 7 W3110 (p65-P1) N°3 clones 1 al 3 W3110 (p65-P1) N°4 clones 1 al 2 W3110 (p65-P1) N°5 clon 1 W3110 (p65-P1) N°6 clones 1 al 11 TMP, STR _L
27P AMP, NAL, CHL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT	BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (p27P) N° 1 CHL, STR _H , TMP, SMX, SXT	W3110 (p27P) N°1 clones 1 al 5 CHL, STR _L , TMP, SXT
29P AMP, NAL, CHL, TET, STR _L , TMP, SMX, SXT	BZB1011 <i>ΔhsdR::kan</i> (p29P) N° 2 al 9 CHL, STR _H , TMP, SMX, SXT	W3110 (p29P) N°3 clon 1 W3110 (p29P) N°7 clon 1 CHL, STR _L , TMP, SXT
*AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; NAL, ácido nalidíxico; KAN, kanamicina; TET, tetraciclina; STR _H , estreptomicina alta; STR _L , estreptomicina baja; TMP, trimetoprim; SMX, sulfametoxazol; SXT, cotrimoxazol; E, aislamientos procedentes de mujeres embarazadas; P, aislamientos procedentes de niños. n.a. no analizado.		

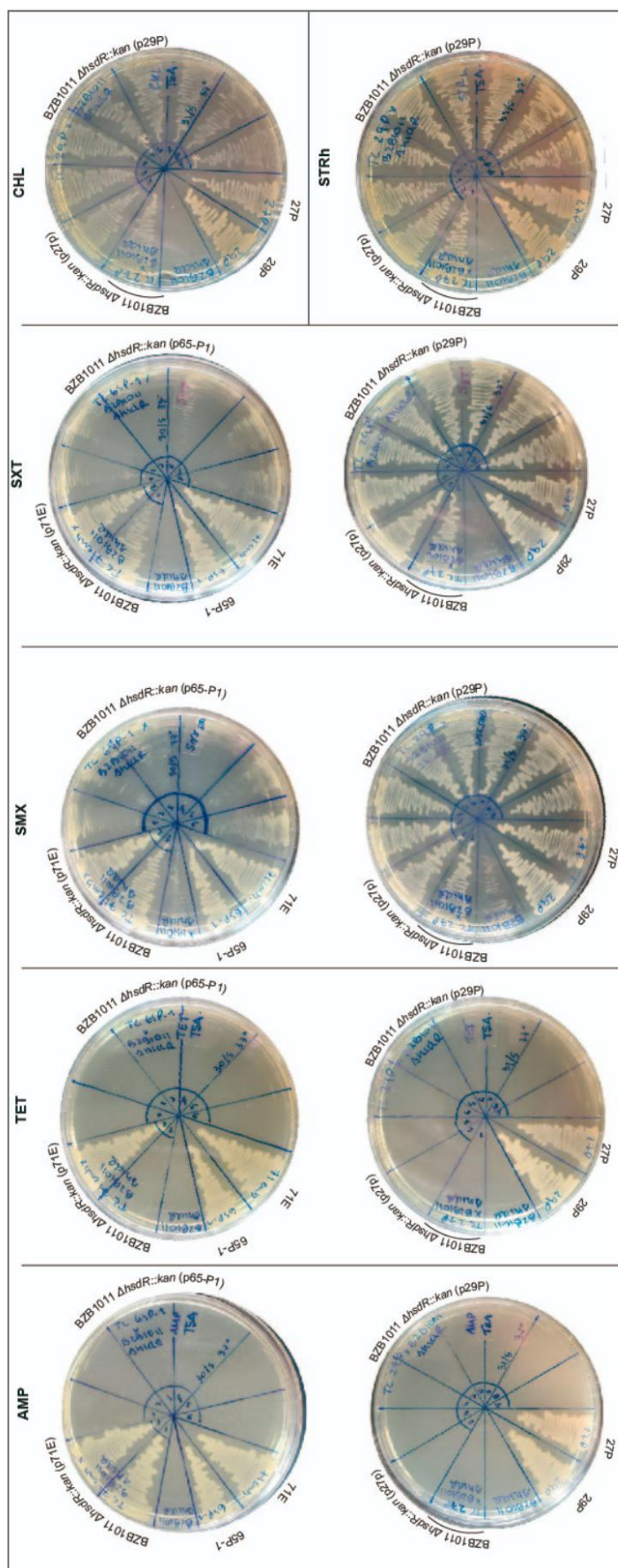


Fig 12. Estrías de los transconjugantes TMP^R Int2⁺ contexto BZB1011 Δ hsdR::kan en placas de LB con los antibióticos incorporados. Se indica el antibiótico incorporado en cada placa de LB. Como controles se incluyen las cepas empleadas en las conjugaciones. 71E, 65P-1, 27P y 29P, cepas donantes de UPEC; BZB1011 Δ hsdR::kan, cepa receptora de *E. coli* K12.

IV.4) Conjugaciones entre las cepas de *E. coli* K12 BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ TMP^R $Int2^+$ y W3110 $srl::Tn10$ (2^{da} etapa de conjugación)

Se procedió a realizar una segunda etapa de conjugaciones empleando ahora como cepas donantes las cepas de *E. coli* K12 BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ TMP^R $Int2^+$ y como receptora la cepa de *E. coli* K12, W3110 $srl::Tn10$ (Fig. 13).

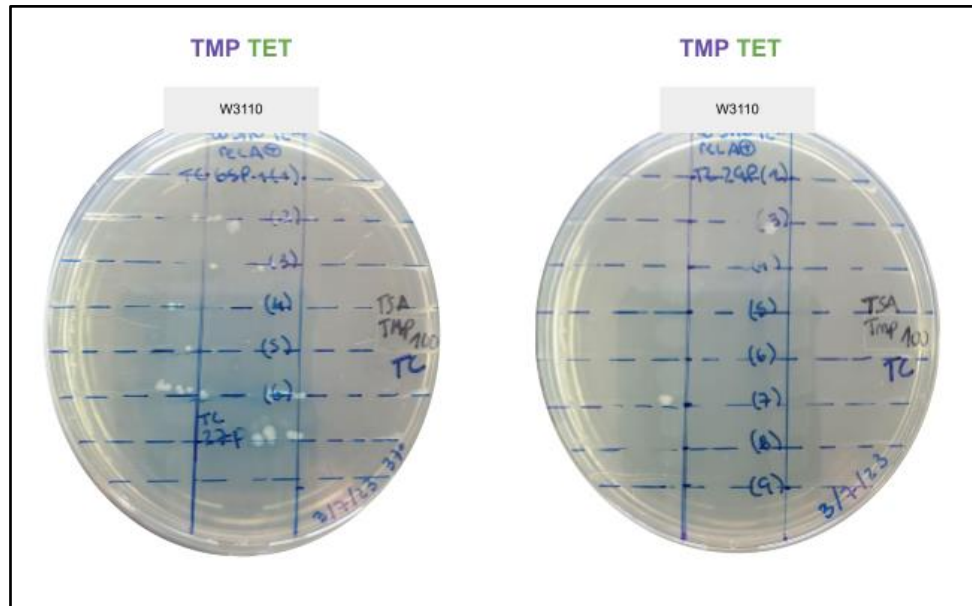


Fig. 13. Experimentos de conjugación. Transconjugantes TMP^R $Int2^+$ contexto BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ x W3110 $srl::Tn10$. Arriba de cada placa se indican los antibióticos usados para la selección (violeta) y para la contraselección (verde) así como la cepa receptora de *E. coli* K12 usada en el listón. Con número, cepas donantes; números dentro de paréntesis, número de clon.

El objetivo de este paso fue estudiar si en los transconjugantes BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ portadores del Tn7 dicho transposón mantenía su capacidad de transferirse horizontalmente por conjugación. En este sentido, recordemos que los transconjugantes BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ (p71E) clon N°2, BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ (p27P) y BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ (P29P), al igual que ocurrió en sus cepas de UPEC donantes, no amplificaron con la pareja de cebadores tanto para el extremo derecho ni para el izquierdo del Tn7 insertado en el sitio cromosómico *attTn7*. Por lo tanto, estos transconjugantes eran candidatos a presentar el Tn7 sólo en plásmidos. Por otro lado, en los transconjugantes BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ (p65P-1) se comprobó la localización cromosómica del Tn7 al igual que en 65P-1. Esta última tenía un Tn7 plasmídico que fue capaz de ser transferido a BZB1011 $\Delta hsdR::kan$. Nos preguntamos si, al igual que en 65P-1, los transconjugantes BZB1011 $\Delta hsdR::kan$ (p65P-1) también presentaban el Tn7 en ambas localizaciones, cromosómica y plasmídica.

En esta etapa se usaron como cepas donantes los siguientes transconjugantes TMP^R Int2⁺: BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1) clones N°1 al 6, BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) clon N°1 y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P) clones N° 2 al 9. No se usó el transconjugante BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p71E) N°2 por ser TET^R, antibiótico empleado para la contraselección.

Se observaron transconjugantes de contexto W3110 *srl::Tn10* a partir de los tres tipos de cepas donantes, BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1), BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P). Cabe señalar que para el caso de BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P) sólo dos clones de los ocho analizados dieron transconjugantes. Para los donantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p65P-1) y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) la mayoría de los clones estudiados generaron transconjugantes (**Fig. 13**).

De esta manera, se confirmó que el Tn7 en las cepas donantes BZB1011 *ΔhsdR::kan* estaba presente en plásmidos conjugativos o movilizables capaces de ser transferidos.

IV.4.1) Análisis de la presencia de *intI2*, *dfrA1* y de *sul2* en los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* TMP^R

Una vez purificados los transconjugantes TMP^R de contexto W3110 *srl::Tn10*, se seleccionaron clones procedentes de las distintas conjugaciones para el análisis de la presencia de *intI2*, *dfrA1* y de *sul2*. Todos los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* TMP^R analizados portaron el Int2 (*intI2*⁺ y *dfrA1*⁺) y recibieron conjuntamente el gen *sul2* (**Fig. 14**). Los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* (p65P-1) no fueron estudiados para *sul2* debido a que la cepa donante ya carecía del mismo.

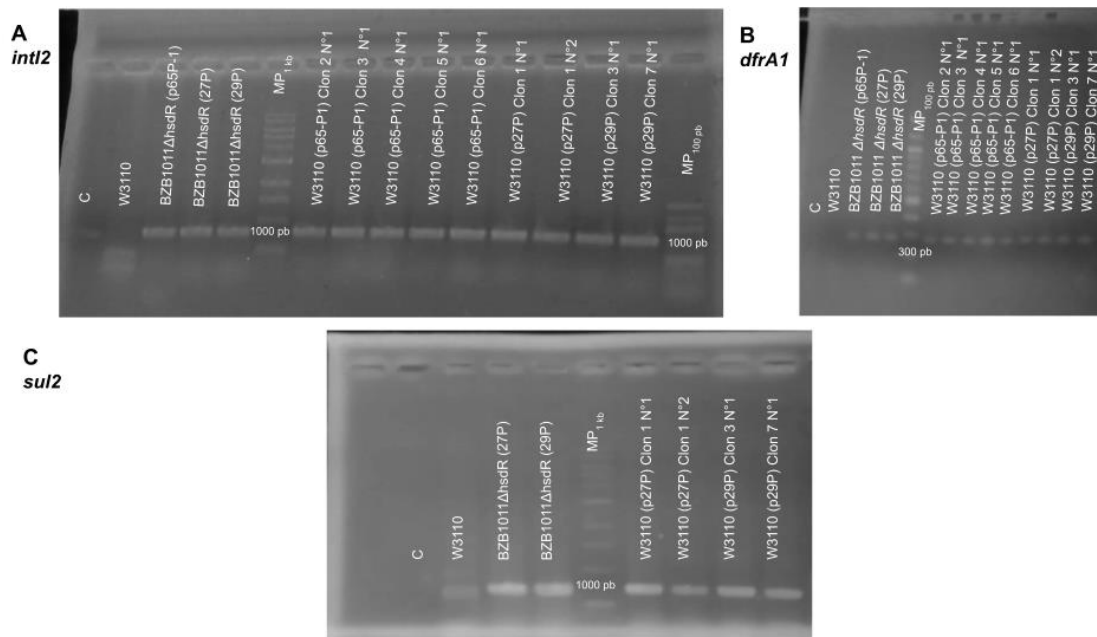


Fig 14. Detección del *Int2* y de *sul2* en los transconjugantes de contexto W3110 *srl::Tn10*. Geles de agarosa de 1% en A y C y de 2% en B. **A)** Fragmento amplificado *int2* (787 pb), **B)** fragmento amplificado *dfrA1* (283 pb), **C)** fragmento amplificado *sul2* (727 pb). C, control de la reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb y 1 kb Biolabs. Se indican las cepas donantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan* empleadas en las conjugaciones. W3110, cepa de *E. coli* K12 (W3110 *srl::Tn10*) usada como receptora en las conjugaciones.

IV.4.2) Localización del Tn7 en los transconjugantes de contexto W3110 *srl::Tn10*

Se analizaron todos los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* *Int2*⁺, W3110 *srl::Tn10* (p65P-1), W3110 *srl::Tn10* (p27P) y W3110 *srl::Tn10* (p29P) para la localización cromosómica del Tn7 (**Fig. 15A**). Los transconjugantes de contexto W3110 *srl::Tn10* se comportaron igual que los transconjugantes de contexto BZB1011 *ΔhsdR::kan*. Es decir, sólo se observó en los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* (p65P-1) la localización cromosómica del Tn7 y, como era de esperar por el genoma de W3110 *srl::Tn10*, el locus *pstS* fue el que se encontró a la izquierda del sitio de inserción del Tn7 (**Fig. 15B**). Es decir, en los transconjugantes *TMP*^R *Int2*⁺, obtenidos de la 1^{era} conjugación BZB1011 *ΔhsdR::kan* (71E) N°2, BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p27P) y BZB1011 *ΔhsdR::kan* (p29P) así como los obtenidos de la 2^{da} conjugación, W3110 *srl::Tn10* (p27P) y W3110 *srl::Tn10* (p29P), el Tn7 nunca se localizó en su sitio *attTn7*, por lo que se deduce que permaneció en el plásmido. Parece muy probable que el Tn7 en estas cepas esté deletado y no pueda saltar.

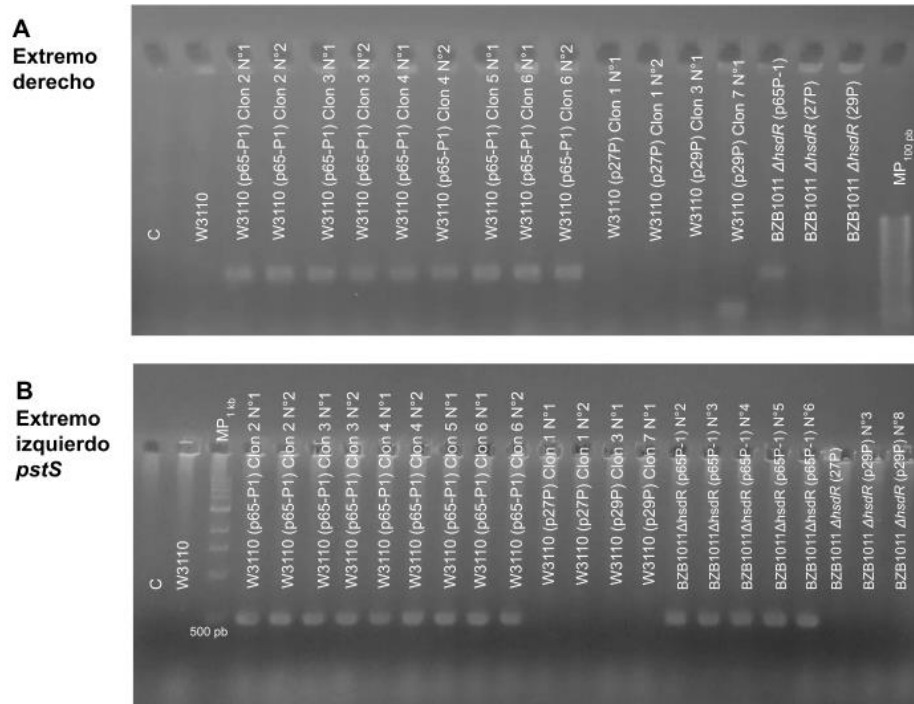


Fig 15. Localización cromosómica del Tn7 en los transconjugantes de contexto W3110 *srl::Tn10*. Geles de agarosa 2 %. **A)** Amplificación del extremo derecho del Tn7 integrado en su sitio cromosómico en *E. coli*, *attTn7* (fragmento Tn75-glmS de 534 pb), **B)** Amplificación del extremo izquierdo del Tn7 insertado en el cromosoma de *E. coli* en cepas portadoras del locus *pstS* (fragmento Tn75'-pstF de 494 pb). C, control de reacción de amplificación; MP, marcadores de peso molecular de 100 pb HyperLadder y 1 kb Biolabs. Se indican las cepas de contexto BZB1011 Δ hdsR::*kan* usadas como donantes en las conjugaciones. W3110, W3110 *srl::Tn10*, cepa de *E. coli* K12 empleada como receptora en los experimentos.

IV.4.3) Análisis fenotípicos de los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* TMP^R Int2⁺

Al igual que para los transconjugantes de contexto BZB1011 Δ hdsR::*kan* TMP^R Int2⁺, se analizó el fenotipo de resistencia antibiótica de los transconjugantes W3110 *srl::Tn10* TMP^R Int2⁺. El fin era conocer las resistencias co-transferidas junto con el Int2. Para ello, se estudió la resistencia a CHL, STR y SXT por parte de los transconjugantes W3110 *srl::Tn10*. Todos los transconjugantes adquirieron las mismas resistencias antibióticas portadas por sus respectivos donantes i.e. todas las resistencias fueron co-transferidas con el Int2 (Tabla 3, Fig. 16).

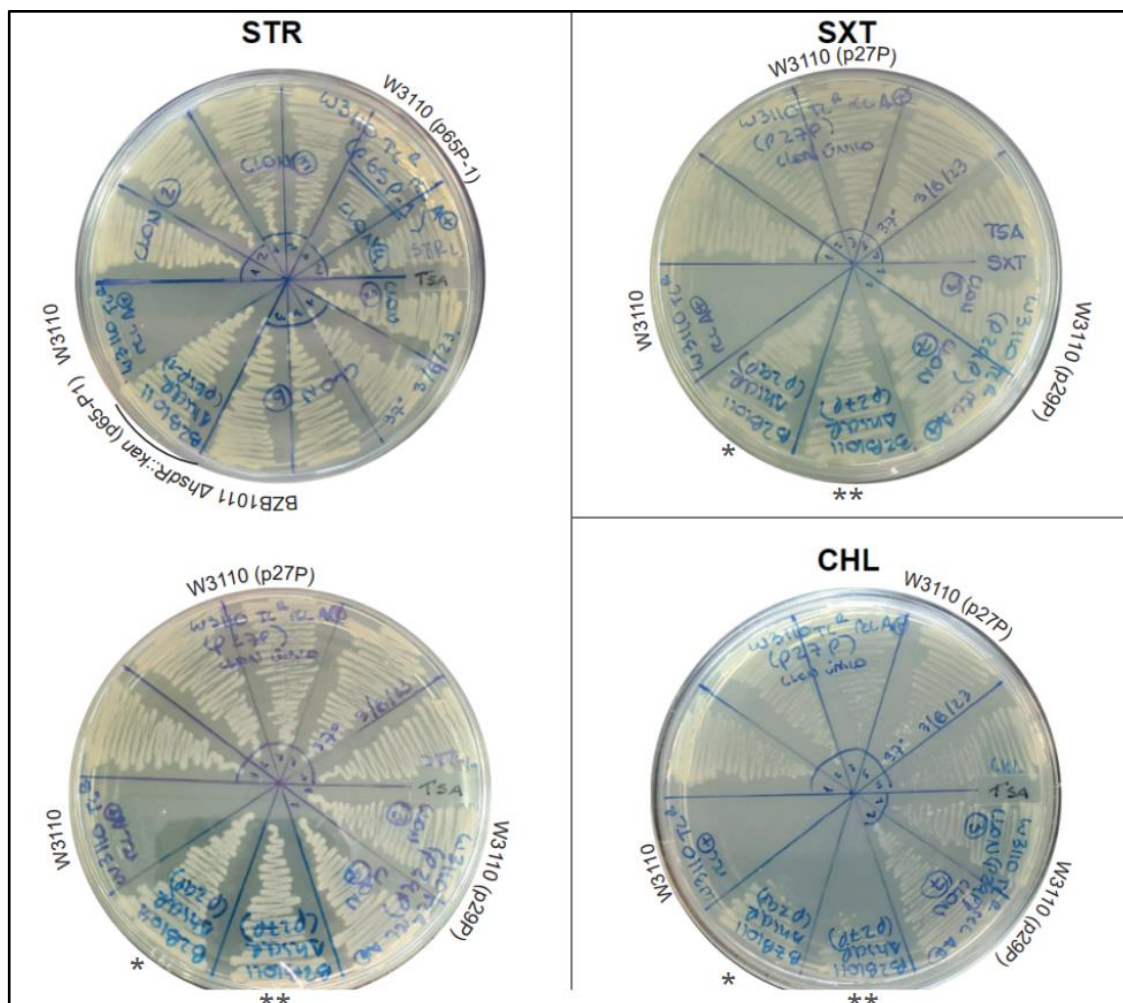


Fig 16. Estrías de los transconjugantes $\text{TMP}^R \text{Int}2^+$ contexto W3110 *srl::Tn10* en placas de LB con los antibióticos incorporados. Se indica el antibiótico incorporado en cada placa de LB. Como controles se incluyen las cepas de contexto BZB1011 Δ hsdR::kan empleadas en las conjugaciones. BZB1011 Δ hsdR::kan, cepa donante; W3110 *srl::Tn10*, cepa receptora de *E. coli* K12; *BZB1011 Δ hsdR::kan (p29P); **BZB1011 Δ hsdR::kan (p27P).

V. DISCUSIÓN

El comienzo de la era antibiótica, hace unos 80 años, marcó un punto decisivo para la humanidad, aumentando la expectativa de vida en más de 20 años. No olvidemos que previo al empleo de los antibióticos las infecciones bacterianas eran una de las causas primordiales de muerte. Sin embargo, paralelamente con su uso en la clínica comenzaron a aparecer bacterias resistentes a los mismos. Más aún, han ido surgiendo bacterias patógenas multirresistentes que limitan muchas veces los posibles tratamientos terapéuticos a emplear. Actualmente, este es un tema de gran preocupación a nivel mundial. El uso de antibióticos con un alto índice terapéutico y que no generen resistencias por parte de las bacterias es un gran desafío. En este sentido, en la carrera antibioterapia-resistencia, las bacterias muchas veces van un paso adelante, presentando mecanismos de resistencia a antibióticos, incluso sintéticos o que no han salido aún al mercado (D'Costa et al., 2006; Bhullar et al., 2012).

En vista de lo anterior, conocer los mecanismos de resistencias antibióticas, así como sus posibles vías de dispersión, es un tema primordial. En este trabajo nos centramos en las resistencias portadas por los integrones de clase 2 y la transferencia horizontal de estos elementos entre cepas de *E. coli*. Como se indicó anteriormente, los Int2 codifican para la resistencia a TMP, estreptotricina y STR. Según la literatura, los Int2 se encuentran dentro del transposón Tn7. Los resultados de los análisis *in silico* de este trabajo permitieron confirmar la asociación estricta entre el Int2 y el Tn7: el Int2 se encuentra portado siempre por el Tn7 (Sundström et al., 1991). De esta manera, conocer la localización del Tn7 en las bacterias, así como la dispersión horizontal del mismo, es conocer la del Int2.

El transposón Tn7 es muy particular ya que presenta dos mecanismos para su transposición. Uno de ellos, mediado por TnsABC+E, permite el salto del Tn7 en forma aleatoria a plásmidos conjugativos principalmente, mientras que el mecanismo mediado por TnsABC+D hace que el Tn7 se inserte con una alta frecuencia en un sitio cromosómico específico en *E. coli*, el sitio *attTn7*. Por lo tanto, el Tn7 asegura su dispersión tanto horizontal (TnsE) como vertical (TnsD) en las bacterias (Kubo & Craig, 1990; Wolkow et al., 1996; Peters, 2014; Peters & Craig, 2001).

Nuestros resultados *in silico*, realizados en el banco de datos NCBI, indican que el Tn7 está presente en un grupo acotado de bacterias Gram negativas, más precisamente en las Gammaproteobacterias y, dentro de este grupo, predomina en las familias Enterobacteriaceae, Morganellaceae y Moraxellaceae. Si bien tanto los Int2 como los Int1

están presentes en las Gammaproteobacterias, se observan ciertas diferencias en cuanto a las familias en las que predominan. En este sentido, el Int2 no parece ser tan abundante en la familia Pseudomonadaceae como lo es el Int1. En este trabajo nos centramos en el estudio del Tn7, y por ende del Int2, presente en la especie *E. coli* de la familia Enterobacteriaceae. En esta especie, los análisis *in silico* indicaron que el Tn7 se localiza mayoritariamente en el cromosoma, en su sitio *attTn7*, con predominio del locus *pstS* a la izquierda de su sitio de inserción en *E. coli*. Cabe mencionar que la presencia de las variantes *fim* o *pstS* a la izquierda del sitio *attTn7* fue detectada en trabajos previos (Crépin et al., 2012). En los dos plásmidos en los que se localizó el Int2, pEcoUTI1f y R721, éstos evidencian genes de la región de transferencia conjugativa, región Tra y del origen de transferencia, *oriT*. Esto último indicaría que se trata de plásmidos conjugativos o al menos movilizables. Además, la localización del Tn7 en dichos plásmidos fue distinta en cada uno.

En lo referente a los análisis experimentales, se pudo corroborar la presencia del Int2 en la colección de cepas de UPEC, previamente caracterizada, así como el fenotipo de resistencia de los aislamientos. Los resultados de la localización del Tn7 coincidieron con los análisis *in silico*, i.e. el Tn7 se localizó en el 83% (15 de 18 cepas) en su sitio cromosómico *attTn7* y, de estas últimas, el 73% (11 de las 15 cepas) presentó el locus *pstS* en el extremo izquierdo del sitio de inserción. Por otro lado, en los aislamientos 32P-1 y 32P-2 las bandas de amplificación de los extremos izquierdo y derecho del Tn7 insertado fueron de menor y mayor tamaño de lo esperado, respectivamente. Si bien estos aislamientos contienen un Tn7 cromosómico, la interpretación más sencilla es que el Tn7 se insertó a unas pares de bases a la izquierda de su sitio *attTn7*, por lo que quizás TnsABC+D haya tenido imprecisiones en el reconocimiento de su sitio. Este tipo de imprecisiones en el salto se han detectado en otro trabajo (Berg & Howe, 1989).

En las tres cepas de UPEC en las que no se evidenció amplificación del extremo derecho ni izquierdo del Tn7 insertado, éste podría estar: localizado en un plásmido, en un sitio cromosómico diferente al *attTn7*, o en su sitio *attTn7* pero que este último se encuentre alterado por rearrreglos que no permitan su amplificación. Considerando que las inserciones del Tn7 en plásmidos ocurren en sitios al azar, no fue posible diseñar cebadores para detectar localizaciones plasmídicas del mismo. Esta localización se pudo deducir a través de ensayos de conjugación, como se discutirá a continuación.

En este trabajo se estudió la capacidad de transferencia horizontal del Int2 mediante conjugación usando las 17 cepas de la colección de UPEC Int2⁺ como donantes y una *E.*

coli K12 como receptora. Se observó transferencia del Int2 en cuatro de los casos (24%), por lo que se deduce que en ellos el Tn7 estaba en plásmidos conjugativos o movilizables. Precisamente, tres de éstos correspondieron a las cepas donde no se había detectado el Tn7 en su sitio cromosomal.

En primer lugar, discutiremos estos últimos tres casos. Los transconjugantes obtenidos de 71E, 27P y 29P presentaron el Tn7 en el plásmido transferido y dicho transposón no saltó a su sitio cromosomal *attTn7*. Los transconjugantes presentaron las resistencias codificadas por el Int2, TMP^R y STR^R, y la mayor parte de las otras resistencias que tenían las distintas cepas donantes. En una segunda conjugación se volvió a tener los mismos resultados por lo que se deduce que el Tn7 quedó siempre en su localización original plasmídica. Quizás el Tn7 esté en estos casos mutado y haya perdido la capacidad de transponerse. En relación al Int1, recordemos que estas tres cepas de UPEC Int2⁺ tenían además el Int1. Sin embargo, no hubo co-transferencia de ambos integrones en ninguno de los transconjugantes analizados. Lo contrario ocurrió para el gen *sul2*, que co-transfirió siempre con el Int2; probablemente *sul2* se localiza en estas cepas en el mismo plásmido que contiene el Int2.

El cuarto Tn7 transferido procedió de la cepa de UPEC donante 65P-1, que lo portaba en su sitio *attTn7* y, con el resultado de la transferencia, se deduce que esta cepa era portadora de dos Tn7, uno cromosómico y otro en un plásmido conjugativo. Es en este caso donde se obtuvieron los datos más informativos en cuanto a la diseminación del transposón. En primer lugar, sólo se transfirieron las resistencias codificadas por el Tn7, i.e. TMP^R y STR^R. El análisis de los transconjugantes de *E. coli* K12 TMP^R Int2⁺ obtenidos de esta cepa 65P-1 indicó la presencia del Tn7 en su sitio *attTn7*, i.e. el transposón había saltado desde el plásmido al cromosoma en todos los transconjugantes analizados. Es de preguntarse entonces si también en estos transconjugantes se mantuvo una copia del Tn7 en el plásmido o si el transposón saltó al cromosoma dejando al plásmido en forma lineal sujeto a ser degradado. ¿Qué pasó con el plásmido? La respuesta a esta interrogante la obtuvimos por el resultado de la segunda conjugación: se transfirió el Tn7 y también saltó al cromosoma en todos los transconjugantes analizados. Por lo tanto, al ingresar el Tn7 a una nueva bacteria, salta enseguida a su sitio *attTn7* cromosómico, dejando una copia en el plásmido.

En la literatura se ha descrito que el salto del Tn7 desde plásmidos conjugativos hacia el sitio cromosómico libre *attTn7* se da con una muy alta frecuencia (Lichtenstein & Brenner, 1981; Peters, 2014).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en estudios previos realizados por el grupo de Alonso et al., 2018 en donde analizaron una colección de aislamientos de *E. coli* portadora del Int2 procedentes de muestras de origen animal y humano de distintas zonas geográficas. En este trabajo, al igual que en el nuestro, detectaron el ligamiento físico del Int2 con el Tn7, así como la presencia, en un 80%, del Tn7 en su sitio *attTn7*, mapeado sólo para su extremo derecho. Además, confirmaron la transferencia del Int2 en un 26%, por conjugación, a una cepa de *E. coli* K12, bajo la presión selectiva de trimetoprim. Es decir, un porcentaje similar al que obtuvimos en nuestro trabajo, del 24%. En este último trabajo no se estudió la localización del Tn7 en los transconjugantes obtenidos (Alonso et al., 2018).

Es importante destacar que en este trabajo se estudió la transferencia del Int2, y por ende del Tn7, desde un abordaje fisiológico, partiendo de cepas naturales y siguiendo la transferencia de plásmidos naturales por el mecanismo natural de la conjugación. El mismo no sólo se centró en la transferencia por conjugación, sino también en la localización del Tn7 en la bacteria. Cabe señalar que existen varios trabajos, desde hace décadas, en los que se estudia el mecanismo de transposición tan particular que posee este transposón. Estos estudios presentan distintos abordajes (moleculares, bioquímicos, etc) y, en varios de ellos, se usan derivados del Tn7, de construcción genética (miniTn7), que se introducen en una bacteria que expresa en trans las proteínas para su transposición (Wolkow et al., 1996; Peters, 2014).

La capacidad del Tn7 de insertarse en un sitio cromosómico (*attTn7*), que no interfiere con las funciones esenciales de la bacteria, así como en plásmidos conjugativos, hace que este elemento asegure su diseminación vertical y horizontal en las poblaciones bacterianas. De esta manera, el Tn7 es un elemento adaptado para la diseminación y el mantenimiento de resistencias antibióticas en las bacterias. Conocer los factores que influyen en la transferencia horizontal del Tn7 y, por ende, de los Int2, que hacen que su presencia se limite a ciertas familias de las Gammaproteobacterias, es sin duda un tema de interés. El estudio de los mecanismos que regulan las vías para su transposición, así como los factores que condicionan su transferencia horizontal contribuirá a comprender las posibles vías de diseminación de las resistencias antibióticas entre las bacterias. Esto último constituye un punto clave para entender el surgimiento de posibles patógenos multirresistentes de relevancia clínica.

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se corroboró la estricta vinculación de los Int2 con el Tn7. En lo referente a la localización de este transposón, se comprobó su presencia en ciertas familias dentro de las Gammaproteobacterias. Específicamente en *E. coli*, se localizó mayoritariamente en su sitio cromosómico *attTn7*, según los análisis *in silico* y experimentales realizados. En lo referente a la diseminación del Tn7 y, por lo tanto, del Int2, se realizaron experimentos de transferencia horizontal por conjugación desde un enfoque fisiológico, empleando cepas y plásmidos naturales. Se detectó la transferencia horizontal de este elemento genético entre cepas de *E. coli* y se comprobó su salto al sitio cromosómico *attTn7* una vez ingresado en una nueva bacteria hospedera. Conocer los mecanismos de dispersión que tiene este transposón, tanto vertical como horizontal, es sin duda importante para comprender la transferencia de las resistencias entre las comunidades bacterianas. El estudio de la diseminación horizontal del Tn7 desde abordajes fisiológicos, como es el de este trabajo, contribuirán en este aspecto.

VII. REFERENCIAS

- Alonso, C. A., Cortés-Cortés, G., Maamar, E., Massó, M., Rocha-Gracia, R. del C., Torres, C., Centrón, D. & Quiroga, M. P. (2018). Molecular diversity and conjugal transferability of class 2 integrons among *Escherichia coli* isolates from food, animal and human sources. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(6), 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.02.001>
- 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), 836–839. <https://doi.org/10.1128/aac.49.2.836-839.2005>
- Aznárez, D. (2020). *Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a trimetoprim en Escherichia coli uropatógeno*. Facultad de Ciencias, UDELAR.
- Berg, D. E. & Martha. Howe, M. (Eds.). (1989). *Mobile DNA*. American Society for Microbiology.
- 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), e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Cambray, G., Guerout, A.-M. & Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 141–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>
- Chowdhury, P., Ingold, A., Vanegas, N., Martínez, E., Merlino, J., Merkier, A. K., Castro, M., González Rocha, G., Borthagaray, G., Centrón, D., Bello Toledo, H., Márquez, C. M. & 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), 3140–3149. <https://doi.org/10.1128/aac.01529-10>
- Crépin, S., Harel, J. & Dozois, C. M. (2012). Chromosomal complementation using Tn 7 transposon vectors in Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(17), 6001–6008. <https://doi.org/10.1128/aem.00986-12>
- Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B. & Rocha, E. P. C. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(10), 4539–4550. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw319>
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 20;311(5759):374-7. doi: 10.1126/science.1120800. PMID: 16424339

- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Domingues, S., da Silva, G. J. & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2(5), 211–223. <https://doi.org/10.4161/mge.22967>
- Domingues, S., Nielsen, K. M. & da Silva, G. J. (2015). Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiology (Reading, England)*, 161(7), 1313–1337. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000099>
- Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., Heeg, P., Ilschner, C., Kramer, A., Larson, E., Merkens, W., Mielke, M., Oltmanns, P., Ross, B., Rotter, M., Schmithausen, R. M., Sonntag, H.-G. & Trautmann, M. (2017). *Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria?* <https://doi.org/10.3205/dgkh000290>
- Kubo, K. M. & Craig, N. L. (1990). Bacterial transposon Tn7 utilizes two different classes of target sites. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2774–2778. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2774-2778.1990>
- Labbate, M., Case, R. J. & Stokes, H. W. (2009). The integron/gene cassette system: An active player in bacterial adaptation. En *Horizontal Gene Transfer* (pp. 103–125). Humana Press.
- Lichtenstein, C. & Brenner, S. (1981). Site-specific properties of Tn7 transposition into the *E. coli* Chromosome. *Molecular & General Genetics: MGG*, 183(2), 380–387. <https://doi.org/10.1007/bf00270644>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
- Neidhardt, F. C. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*". ASM Press.
- Partridge, S. R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 820–855. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>
- Peters, J. E. (2014). Tn7. *Microbiology Spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0010-2014>

- Peters, J. E., & Craig, N. L. (2001). Tn7: smarter than we thought. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(11), 806–814. <https://doi.org/10.1038/35099006>
- Poey, M. E., Albini, 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), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.02.006>
- Poey, M. E. & Laviña, M. (2014). Integrons in uropathogenic *Escherichia coli* and their relationship with phylogeny and virulence. *Microbial Pathogenesis*, 77, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.11.002>
- Poey, M. E. & Laviña, M. (2018). Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microbial Pathogenesis*, 117, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.006>
- Shi, Q., Straus, M. R., Caron, J. J., Wang, H., Chung, Y. S., Guarné, A. & Peters, J. E. (2015). Conformational toggling controls target site choice for the heteromeric transposase element Tn7. *Nucleic Acids Research*, 43(22), 10734–10745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv913>
- Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3/4), 261–273. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
- Sundström, L., Roy, P. H. & Sköld, O. (1991). Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *Journal of Bacteriology*, 173(9), 3025–3028. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.3025-3028.1991>
- Trobos, M., Jakobsen, L., Olsen, K. E. P., Frimodt-Møller, N., Hammerum, A. M., Pedersen, K., Agersø, Y., Porsbo, L. J. & Olsen, J. E. (2008). Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(4), 367–369. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.021>
- Wolkow, C. A., DeBoy, R. T. & Craig, N. L. (1996). Conjugating plasmids are preferred targets for Tn7. *Genes & Development*, 10(17), 2145–2157. <https://doi.org/10.1101/gad.10.17.2145>
- World Health Organization, WHO Model List of Essential Medicines (20th List), 2017. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.
- 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(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0516-2>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Filogenia, presencia de *intI1* e *intI2*, genes *sul* y fenotipo de resistencia antibiótica de los aislamientos de la colección de UPEC Int2⁺

Cepa	Filogenia	<i>intI1</i>	<i>intI2</i>	Resistencias a antibióticos*	<i>sul</i>		
					1	2	3
11E	B2	+	+	AMP, CHL, STR, TMP, SMX, SXT	+	-	-
71E	D	+	+	AMP, TET, STR, TMP, SMX, SXT	+	+	-
27P	B1	+	+	AMP, NAL, CHL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
29P	B1	+	+	AMP, NAL, CHL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
5E	B2	-	+	AMP, NAL, TMP	-	-	-
29E	A	-	+	STR (leaky), TMP	-	-	-
34E	B2	-	+	AMP, NAL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
56E	A	-	+	STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
69E	B1	-	+	STR, TMP, SMX, SXT	-	-	-
18P	A	-	+	NAL, STR, TMP (leaky)	-	-	-
32P-1	A	-	+	AMP, CHL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
32P-2	A	-	+	AMP, CHL, TET, KAN, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
64P-1	A	-	+	AMP, CHL, STR (leaky), TMP, SMX (leaky), SXT	-	+	-
65P-1	B2	-	+	AMP, NAL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
71P-1	B2	-	+	AMP, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
74P-2	B2	-	+	AMP, NAL, TET, STR (leaky), TMP, SMX, SXT	-	+	-
74P-3	B2	-	+	AMP, NAL, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-
78P-1	B1	-	+	AMP, TET, STR, TMP, SMX, SXT	-	+	-

AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; NAL, ácido nalidíxico; KAN, kanamicina; TET, tetraciclina; STR, estreptomicina; TMP, trimetoprim; SMX, sulfametoxazol; SXT, cotrimoxazol; E, aislamientos procedentes de mujeres embarazadas; P, aislamientos procedentes de niños. *Resistencias antibióticas analizadas en este trabajo.

Anexo 2. Secuencia nucleotídica del Tn7 integrado en el sitio *attTn7* del cromosoma perteneciente a la cepa de *E. coli* AH01 (Nº acceso NZ_CP055251.1).

```

1 aattttatattt ttaaataatta ttttaaacagt aaaaaaatcaa gtttggtatc agacattaat

61 gataattcag aatatattta tatagaaaga tagatgaatt tattgatgtc agttataaaa
    Repetido directo Repetido imperfecto invertido
121 aagggccacc ggtcggcagc cctgtgggcg gacaaaatag ttgggaactg ggaggggtgg
    Primer Tn75'
181 aaatggagtt ttttaaggatt atttagggaa gagtgacaaa atagatggga actgggtgta

241 gcgtgtaag ctaatacgaa aattaaat gacaaaatag tttggaacta gatttcactt

301 atctgggtta ctaatctagc taacctgccg ctgagcttag tacgatccta tatccaactg

361 atcataatcc tttcatcagt atcccaaatt aaatccccct cctagactgc ctcaccaaca

421 ctttacagtg atcccgatatt tccggacagg tgattgattt ttttcgcttg tacagggtgt

481 aagccacagt tatcttgatg tggacattat gatttgtaat agcccattaa catgogctaa

541 gagcataaat taatatacag taacaagcat tacgaggtgc taatgtttgg aaagcagcct

601 cttccaacta caataataag ttaactatcc tccaccaca aataattaca aatgaccctt

661 ttccgctata actccgatct caccagcggc tcgctacaaa cccgagagtg tcgcattatt

721 actggcttgt tactccaaga gcttgatgaa gctgcctggg ataaagccat gtataaggaa

781 aatgtgcttc agaaacgcac gcaatctacg gtaagacgta tttcttcagc gcttagaaaa

841 cgctagaac acctaagctc tgacttttgg gcttttgcgt ttttatgtta ggcattgtct

901 ggcaactgga ggaagtgtaa tgaccatgaa tggtcactgt gattgacagt atcttgctta

961 aacttatctg aacaatggta gaactggctc atatttatcc cctctatgat tgtttatctt

1021 tttcaccata aaaagtatca ggggctactc agggctacat aaagatattt atctactt tt

1081 actgattgat aagtagcatc agtccatccg caggactggt ggtgccggca aaatgctgac

1141 ccaacacatg cgtatagatt tgcgtggtct taacatcggt atgccctaag agttcttgca

1201 cagtgcgaat atcacgcccc gcttgtaata gatgcgtagc aaacgagtga cgaaatgtat

1261 gacaagtgcac acgcttgcta acgatgcctg ctttttgtac ggctgccttc aatgcctttc

1321 gcgcaacgga gtcattgcaga tgatggcgcc ataatttgcc gttatacggg tggttgacga

1381 gcgtgctgga gggaaagaca aacatccacg ccgcttgctc ataagcagaa gggatattgt

1441 gatctaaagc aaaaggcagc gatggcccta cgcttgtaa gttgtcgtct tgctgaataa
    *
1501 gccgcgcttg ctcaatgagt tatttttatt ctgggattag gcgcgtgggc agtaggctgt

1561 ttctgctttt cccaccctta ccgtcatgca cagtgatgca gccattatca aaatcaaaat

1621 ctttaaccgg caaacgcaag cattcattaa tgcgcaaacc tgcaccatac agcagcgtaa

1681 aaataacttg gttgcgagta tccataacct gcaaaatgcg ttgcacttca tttgcagaga

```

1741 taacagaggg tagccgtcta ggcttgcttg cagggatata atcaatatcg cccaacggct
 1801 gttgtaaaaa cctgttgtag aaaaaagcta gggcatttaa agcgattttc tgcgtgttta
 1861 tggctacatg tctgctgttt gctaagctgg ataaaaacag cctgacctct tcaactgccca
 1921 tggctctgagg atgacgtttt ttgtgaaaca gaataaaacg cttaatccag tgcaggtaag
 1981 ttttttcagt tttcagcgca taaccttttt gtgcgcatatc cgtgcgtata gaatttaaaa
 intI2
 2041 atggactggt agacataaaa cgctccttgt cttgcaactg tctgcctata cagcctattc
 2101 tagctgggat ttaaaaaagt gcctgttttt tacgcctaga gatgcttggt taccggtaga
 2161 gttttaattt aatgctaaat aaattaaaat gttatgagtt ctttgggtga gataatgtgc
 2221 atcgtgcaag caggatagac ggcatgcacg atttgtaata acagagtgtc ttgtattttt
 2281 aaagaaagtc tatttaatac aagtgattat attaattaac ggtaagcatc agcgggtgac
 dfrA1
 2341 aaaacgagca tgcttactaa taaaatgtta acctctgagg aagaatt**gtg** aaactatcac
 2401 taatggtagc tatatcgaag aatggagtta tcgggaatgg ccctgatatt ccatggagtg
 2461 ccaaaggtag acagctcctg tttaaagcta ttacctataa ccaatggctg ttggttggac
 2521 gcaagacttt tgaatcaatg ggagcattac ccaaccgaaa gtatgcggtc gtaacacggt
 2581 caagttttac atctgacaat gagaacgtat tgatctttcc atcaattaaa gatgctttaa
 2641 ccaacctaaa gaaaataacg gatcatgtca ttgtttcagg tgggtggggag atatacaaaa
 2701 gcctgatcga tcaagtagat aactacata tatctacaat agacatcgag ccggaagggtg
 2761 atgtttactt tcctgaaatc ccagcaatt ttaggccagt ttttaccbaa gacttcgcct
 2821 ctaacataaa ttatagttac caaatctggc aaaaggg**ta a**caagtggca gcaacggatt
 2881 cgcaaacctg tcacgccttt tgtacaaaaa gccgcgccag gtttgcgac cgtgtgcca
 sat2
 2941 ggcgttaggc gtcat**atgaa** gatttcggtg atccctgagc aggtggcgga aacattggat
 3001 gctgagaacc atttcattgt tcgtgaagtg ttgatgtgc acctatccga ccaaggcttt
 3061 gaactatcta ccagaagtgt gagccoctac cggaaggatt acatctcgga tgatgactct
 3121 gatgaagact ctgcttgcta tggcgcatte atcgaccaag agcttgctcg gaagattgaa
 3181 ctcaactcaa catggaacga tctagcctct atcgaacaca ttgttgtgtc gcacacgcac
 3241 cgaggcaaag gagtcgcgca cagtctcatc gaatttgca aaaagtgggc actaagcaga
 3301 cagctccttg gcatacgatt agagacacaa acgaacaatg tacctgcctg caatttgtac
 3361 gcaaaatgtg gctttactct cggcggcatt gacctgttca cgtataaaac tagacctcaa
 3421 gtctcgaacg aaacagcgat gtactggtac tggttctcgg gagcacagga tgacgcc**taa**
 aadA1

3481 caattcattc aagccgacac cgcttcgcgg cgcggttaa ttcaggagtt aaacatc**atg**
 3541 agggaagcgg tgatcgccga agtatcgact caactatcag aggtagttgg cgtcatcgag
 3601 cgccatctcg aaccgacggt gctggccgta catttgtagc gctccgcagt ggatggcggc
 3661 ctgaagccac acagtgatat tgatttgctg gttacgggta ccgtaaggct tgatgaaaca
 3721 acgcggcgag ctttgatcaa cgaccttttg gaaacttcgg cttcccttg agagagcgag
 3781 attctccgcg ctgtagaagt caccattggt gtgcacgacg acatcattcc gtggcggttat
 3841 ccagctaagc gcgaactgca atttggagaa tggcagcgca atgacattct tgcaggatct
 3901 ttcgagccag ccacgatcga cattgatctg gctatcttgc tgacaaaagc aagagaacat
 3961 agcgttgctt tggtaggtcc agcggcggag gaactctttg atccggttcc tgaacaggat
 4021 ctatttgagg cgctaaatga aaccttaacg ctatggaact cgccgccga ctgggctggc
 4081 gatgagcgaa atgtagtgct tacgttgctc cgcatttggt acagcgagc aaccggcaaa
 4141 atcgcgccga aggatgtcgc tgccgactgg gcaatggagc gcctgccggc ccagtatcag
 4201 cccgtcatac ttgaagctag gcaggcttat cttggacaag aagatcgctt ggcctcgcgc
 4261 gcagatcagt tgaagaatt tgttactac gtgaaaggcg agatcaccaa ggtagtcggc
 4321 **aaataa**tgtc taacaattcg ttcaagccga cgccgcttcg cggcggcggt taactcaagc
 4381 gttagagagc tggggaagac **orfx**
 4381 **atg**cgcgat ctgttgaagg tggttctaag cctcgtaact
 4441 gcgatggcat cggggcaggc acttgctgac ctgccattg ttttagtgga tgaagctcgt
 4501 cttccctatg actactcccc atccaactac gacatttctc caagcaacta cgacaactcc
 4561 ataagcaatt acgacaatag tccatcaaat tacgacaact ctgagagcaa ctacgataat
 4621 agttcatcca attacgaaa tagtcgcaac ggaaatcgta ggcttatata tagcgcaaat
 4681 ggggtctcgca ctttcgcggc ctactacgct attgccaaca atgggacaac gaacttcttt
 4741 tccacatctg gaaaaggat gttctacacc caaaagggg ggccggcgct ctatggcggc
 4801 aaagatggga gcttctgcgg ggcatgggtc gtcataaatg gccaattttc gcttgccctg
 4861 acagataacg gcctgaagat catgtatcta agcaac**tag**c ctgctctcta ataaaatggt
 4921 aggcctcaac atctagtcgc aagctgaggg gaaccactag tgtcatacga acctccaaga
 4981 gacggttaca caaacgggta cattgttgat gtcattgatg acaatcgccc aagtaagtat
 5041 ccagctgtgt tcagaacgta cgtccgaatt ccagactatg tcgaactaga taacgcggag
 5101 gagctggccg acgcaatcat tcgagaggtt gagttaaagg aggcattggc cacaagggtc
 5161 ttggggaact cagccgatcc tgacgcttct gtgggcaagt gggaccggcg cctagcgag
 5221 tgcggtggta ttgatgagat gtcaagtggg gtgcaggcaa catacttcag tccaaacggt

5281 cagctgggtcg gcttagtggc atacattgat gccgaatgga tggatgaata gctctgacgt
5341 tacgattcag gtgagacaac cagatgggca ttgcgtacaa gtcagttgc caccgatgtg
5401 gctacgagtc tgatcttctt tacctaggcc aaggatggc gatgcttctt gagcaaatag
5461 tcggaacgtg cacatgctgc gacaatctaa cgacgatttc tataaatgaa agctacggag
5521 tatgctcact ttgtggggct aaggatcgtg tgatatattac aagctatcag catgaggcaa
5581 ggccaagaaa tccctgctat ctagagagaa gtttcaaata tcaatgccca agatgccatg
5641 ccttcagtat ggagcctccg gatctaccgg agatgctttg ggactaatgc tccgctttgc
5701 ctggggtatc cgttcgacct atgtttaaga ggaaacgcac gtgtctgccg ccaaagctct
5761 tgcctatgca ctttgtgaca agttggaaag caaaaaagtt gatgaagtcg tacgaaatct
5821 tgtttctagc ggctggaata ttaggggaagt ggcttgggaa gcttcgtcct ttgatcatga
5881 aatgcctac ttgacacgg ggcgggactt cgatattgga tttcctgaca cgctgtcatc
5941 caagattgag tttttgaccg cgaatggatc aatcgccaa gcacgtgctc gcctgcactt
6001 caagcaggct ctaatttttg ccaaggcgct caaacatgct gccgcgtca agaactcatt
6061 ggattactac tatggatcgt ctgtaatccc ccctcaaaac cacggaggct atttgtagaa
6121 aattccatta atatgaactc aagggtgttc ctacggacga atcagcgatg aagggtggtg
6181 acctggctat ccaggcgccg accaagaaat ggacgatgcc gatccgcaac tggaagccgg
6241 ccatgaaccg ttttatgacg gaatttggtg accgttttaa tggccacctt taactgaccg
6301 gaaaagcac ttacacaaaa gggtttacag gctctttcag tcattcct**tt aatgcgtaaa**
6361 **ttgctctcta accactctct cagcccaccc ttccatatcc tctctcgata cttgcagctc**
6421 **ccccaacccc ttgggatgat tcacccctct atgcccgtct tgtccatata attgatcaaa**
6481 **caaaactattt ggccaattca atgagctctt caccactcca cgccgtatct tttcaaaatc**
6541 **attccgcat gtttcgctat caacgccact caacactttg gtagaaagca ttttcacccc**
6601 **atccgatgca tccacctcta gcaatacaaa ttcactgcca ttacgttgca cccaacggc**
6661 **tttaatcact cttggtgagc catctttaca cagatgtaat cggctacgcc caacttttgg**
6721 **caaaaccaag gtttcttcaa aaagcaccgg acatgcaaat ttagttttta gaattgaaag**
6781 **tagctcatca aaagcagcaa atcgattagc aaaaatagag ttgtaattgg ttgcatcctg**
6841 **cttcccaccc acatctgccg ctgctaggac accacctaag tgtggctcat cagtactaac**
6901 **caaattacta ttttcacttg ttgttgcttc ttctttttct aaaatagttt ggctactttt**
6961 **tcttgccctg cgagattttt caattcgact aggtctacta aaacttatcc atgtcggctc**

7021 agcctctatg actcgtgtgt ctgtgtctat attggctgtt tcctcatcgt ccaactgtag
7081 atgctcatca tcaacaactg actctgttga aaccgctatg tgctgcgtac taccatcacc
7141 tgcctccttt tcctgaaaag aggcattggct aatagctgtt gtgctaggaa gcatagcgtt
7201 gattttctaaa cctactatct cctcaactaa ataattctta tcctcggttag aagaacgtcc
7261 ttttacctgt aattttccac cctgcatggg cggagggtca aagctaaagc accagctttc
7321 aacgcggttc ttaattttct tattttgttg atagtgccta aaaatacttt catacgaatc
7381 cataacatct tgatccgaaa acaaccaaac caaaagctgc actacggccg actgctctaa
7441 cgccctttaa ggaaacgatg aactgggtaa gatccttatt tctaaatgat ctcgctcaac
7501 ctcatactga acgtcgaact cttgctgtaa agcgggtactg ctcaaacagc ttcgacagaa
7561 ataggagtta attaaaaata atgaccgagc tagctctaac tgtgggatgt gataacgagt
7621 cttgctatat ggtgtttcag cttcgtaaat aatgaactc tgcgctccat cctgtttgcg
7681 tacggaagca aaggacgaga gattaggaaa atcgattatt ttggctcgtt gaagatccga
7741 tgcttcaaac tcaatcacac gatccgcctt atttatttgc tttgttgtac tgtaaccac
7801 cttagctcga cttataaag gcaaatgagt aaatcgagtc catttccggt cttg**cat**tg
7861 attaaaccaa acaaaaatac gccactcctt atgaccgag ttacggaata aatgaccaat
7921 atgtacaacc tgcacattgt cattaaatgt agctagccta accac**tca**act cttccccata
7981 aaccatttcc aagaatcttt gtgcttcttc agttatccgc tcttttagata acgttgcaact
8041 tcttaataat cgccagcgcc taagctcaac atcttctgt ttaagcttaa taaaagcttg
8101 gctaatacgt ctaatttgat aatcttccac actctctgag taacgcttta agcaaagcgc
8161 taccaaaggc agtttctgta gatTTTTTgc aagagagggt ccgttaggag tttgctttaa
8221 cagccagctc gatgtcgctc ttgggtgatc aaggctacta tctagacgct ttatgattct
8281 taatagtgtt cgtacagcaa ttgatctct ttggttccaa tcaactctag gggcggtgc
8341 cagacgctct tgttgatgct gttgattcca gtgaactagc caatccctgt catgtcggta
8401 aagccaagcg tatagcacc caccctctaa agactgtctt gccgccttaa ttccttggtta
8461 tttatgcact agttgctgcc agtctttatg cttaacagat aaatcttcag agttagggtg
8521 cacagactgg ctaacaggtc ttgtcgttat agagtgtca gtaagagcac ttgcctgctg
8581 tagcgcttct ataaccgtta gttttggcaa taaggcttgc cacacaatac tatgctgtaa
8641 ataactaaag gcttttctat gcttacggaa tatacttttc agccaacacg tgccttgtt
8701 ctctgccaac tttaaatcca gtttctctag tgctcatca ctaaaagtct gcctcactct
8761 ctccgccacc aagtcatgac gaatgtgctt gcttttgggt agccctagat cctgcgctaa

8821 gcgctgataa aacagcgtcc actgctcaag gcttggggaa agctcttgcg ctcggtggagc
 8881 atctaacaga ggggctatat aagcagctag tgctgttaat tgagataggg agtctttggg
 8941 gtagtctgaa agcagctcag tatgacccaa agcccaaaat tgatgtcggg gatcatctac
 9001 agctctatca aagaagacta aagcacctg ttttggacaa tatggcaaag cgggcaaata
 9061 ccaatctcgt tgccaaaagg cttccccata cctattttagc tgaagagcaa cgcaatcagg
 9121 gcagtatcta aagcggttat cgctcttaac tctagaagca gcgactccta gcattaaatg
 9181 caccgcacct tgcgcttggt actccattaa ccgaatagct tcgtctcggc gtccttgcc
 9241 tacaaacgga gcatataaag ggaataaggt atgctcataa ataagctgct gaacagcgta
 9301 acgtcctggt tgatgtagat gtcttgctat cacacctaaa tgcgagggca gacctaaagt
 9361 agcgaccacc ttgcggttgc catacacctc atccaacagc tgcttaggac taacaatccc
 9421 ttgataaacg cctgccgtg caatagtgtc ataaatcagc tcattcgagt acggaacagg
 9481 **tnsD**
 aaagtttctc atggaactaacc tgcttgttta aataagctcg ccatatccac tattaccct
 9541 ttccctttta accgttcatt catggttttt tcaggttggc gttgtgaata gatataacgt
 9601 aaatccgtat caggcaagct atcccagtcg ctgggcttga ctacctttat agccgaaacc
 9661 tttttactct tggagggctt ttctagttct gacactaccg tttgccttc catcaaccac
 9721 tgcaaaacaa gaggcagtaa cttttgtctt gtcacgttg gattctggct aaacgctttt
 9781 ttaatagtgg gaattaacag gcttgaatcg taatcctctt tcagcatcag atataaatga
 9841 cgctgatctt cgttatctaa ctcttgaagg gctttttctt ctggtgtttg ttcttgtatc
 9901 gctgcgatat ctagctgaag ttggattaac cgtttatcaa tctcggaac gactagatca
 9961 gaataacgag caatgcgttc tgggataccc gagcgtaatg cctctagcat ggggtgcaca
 10021 ggctttaact catcttgata cacttgccgc aataaaccag cggtaatag ctcatgacct
 10081 aaagctagcg cacggagctg agcgagtaca aaaagtttta ctacaatgtc catcactcct
 10141 tggcttagct cataccacac atcacggacc tcatccgata acagcgcac tttgogttgt
 10201 aaaagctgta attgcaaag attatccgta aaagcgatcc actcttgatt gggctttcca
 10261 cgttgcgttt gttgtatagg atcccagaat atagctcaa accctgcccc tctacgtgca
 10321 gaccgcaaat cagcctcaaa aatctctcgt gctttagggg taccaatcaa catcactggt
 10381 acgccaataa tattcaccat cgtcacaaaa aagttcagca tctcttgaga tccacccgaa
 10441 cgagagcggc ttaaagtctg aatttcatca ataaccaaca accctaaagc atgtgcattg
 10501 gctatttgcg acatcaaagc caacatgggt tctataccat gacgttttaa gccataacga

10561 cgctcatagt tcgagcccaa ggctcgatcc aacgctctga aaaaattcaa gcagatttct
10621 tttagcgaac cattatgcga gcagtctatt ttcaaataca ccacctgctc tacattgagt
10681 tcacgatggg aaatcacctg aggatacgtg gctagaatac gatgaagaga ggctgctctc
10741 ccactaccag aacaaccaat taacaataag ctttgtgccg tagatcgtgc ctccctcaaag
10801 cgaaatgtct ccaactctcc cgtttgaaca cgctcataac cattttgtaa atgcttttgt
10861 aaatctcctg ttttaggatt tctgcctacg tagccacctc gaatcatgac cgaaatacgc
10921 tcacttagta gcaaatacgt acctaattggc tgaaaatagt catctggaat acgacaaatg
10981 gtatgagctc tgataacacg ggacttttgc aagtcagagg aagtaagctg taaagaggat
11041 ttcagtgatg cagcactatt cactgactct tgtaatgggt gtaaggcctc gataaaagga
11101 ttatcacgat aagcctctac ccccgatatc cgataaactg cttgaatccg ggtagcactc
tnsC
11161 **at**gactcatc cttttctggt ggatcctgaa ataattcagg cacgtatgtg ggtaggctgt
11221 aatcttcttg atcatcgcgt tccactgcgt tgaaaggaat aactttagcc tcatcacctg
11281 aagagcttgg cttcaaatgc tccgcacgtt ttttacgctc cgaggtcacg gcttcttttt
11341 tattagtttt aatctgctta atgcgtgttg atttgggctc agtagtactg ggcgttaact
11401 tattcgcttt ctgaatgggt tgctgaataa acgcctcaag ctccctgcgt ttagttaact
11461 catcctgctt cgcatgtggt ttattgtggt tttcttgtgc ttgtatatcc caaacctccc
11521 aaaatgagag acctttaaac tgccgactac gttccgtcag attacagcgc caaaatacac
11581 ggctgccaac ttgcggaaac aaataaatcg tatcaaccag cactgggtca taagccgctt
11641 ctaaatgttg aggtctagct atatcagtgc tccgctgcaa ccaaccctca cgcagaatct
11701 ctgaccccca gtaatacaaa cccacaaat taacgccaaa tgaagaaata gagaccttct
11761 ggcgaggcag taacgctact cgcaactgct cttgctccac agcccttaaa ctacctgtac
11821 gatgctgcat accccattgc catagctgga caggaataga cggtaaactc gtaggaaaat
11881 cagcatctcg atcgatttta tccatcacca gatgggttatt tctgaataag atcgtagca
11941 aaataatttg tgtgaactca aataccgaca gagatgcatc taacctatag tctgtttcac
12001 catggctttt gatccgactg ccctctacaa tgccagggtgc aaaggactta aactcggctt
12061 gtagtggtct aaaagtgctt tccactatgc ctttagcatc gccacgtcta ggtggagcac
12121 tttccactcg cacattaaaa ctagaaacta aggcctcgac ctgatgactc attaatcgc
12181 cacggtccgc tagcaacaca tctggcaaac ctacacacgg ccagtctgag ctactaatct
12241 caatatcatg ctgggcacaa atggccggtt tgtcagagca agcatttaca aaagcctgca
12301 tcgccaccac ataagacgga ttttcaaagc cgatataaaa gcccgatgc atccgactaa

12361	acacatcaat	cacaatgtaa	agcgttggtc	ttcctatgat	tttttggcga	tcatgatgat	
12421	ccactaaata	aatatcagca	atcgtggcat	caatctcata	acgactccca	gggcctaacg	
12481	cctgagaagt	ggctgtacta	cttaagggtc	gtacgtcttt	tttatatacc	cctgctttaa	
12541	ctctagactt	taagcgctga	gctttagggt	attctcgatc	ataaaaataa	cgaaactgac	
12601	gtagtgttgg	gtaatcctct	tggggaatgc	gaggaaaata	ctgagcaaac	aagtccacaa	
12661	atcgtctata	ggcaacggtg	gtctttgtac	ctttttgatt	taacagggtgc	ttttctatgg	
12721	tcaacctaaa	aaggcgttca	atctcgggcg	ttaccttggt	tccttcaccc	ttaccatatt	
12781	ctctggctcg	gccaatcttt	gctgttctcg	tcgctgaacg	tctttccoct	ggtgcaccgc	
12841	tgtttttgta	gtcaggaatt	aatgcattag	gcgtttgacc	acgctgccag	taacggcgta	
12901	acaacttata	aactgtagcc	ttagtaacct	tatgttcttg	gaccacatgc	tcaacgagtt	
12961	cgcttctgac	tttagggctg	aaacgatcct	tactattaat	aataggaaga	atttttcgat	
13021	aatcctctc	gcgcttctgg	aagctgacag	aatctacaga	cggtcttct	aatcaagat	
13081	gtacataagg	gtcatcagtt	ctaactaagc	ggccttcac	taaatactgc	attagcaaca	
13141	actcagccct	agcttggtga	actcctttat	cagcgcttat	ttgcatccag	acaacttggc	
13201	catcctctat	agccaaaatg	cgatacggat	cattatcaaa	tagcacaacc	tca	tttaattt
	<i>tnsB</i>						
13261	gccacat	agc	gcaactcctc	catattcact	acttggttaa	tacagagatc	tgcacactta
13321	tttgccctga	aagacttata	aatattgaac	ttaataaaac	catttgcggt	taaggctcgt	
13381	atctcactca	atgttttgcc	taactccaaa	tcataagcaa	tatcaacctg	cttacagaca	
13441	ttgataatgt	tttcatctcc	tttttcttgc	aggatatggg	ccaatgggga	tagttgtgct	
13501	aaaagctcgg	cagaaacttc	ttctgttttc	actgaataaa	gccattcaat	attttctttt	
13561	actacgggat	ttattttctt	atcagtaaaa	atgaaccaag	gaatttgctt	ttgctgocaa	
13621	tagcgacgct	ctagttctag	tttttctaag	gtacgctcgt	cttgtaaggc	tgctgcaggt	
13681	ttgacttgaa	tagcaaaactg	ctcaaaagga	ccatctttgc	agtcocactaa	aaaatcagta	
13741	gacataacct	gatctacacc	acgaataaca	ggatgcttaa	taccactatc	tattgcaatc	
13801	tgcttggtat	cactaggtaa	taagggggaac	tgctcgcgta	tatctagcac	gctgctctcc	
	Primer Tn75						
13861	cactcaagac	tgagaaaaac	agcaagctct	aagtcagata	gcaaatgatg	gactcgtccc	
13921	gtcttatgag	aataaaatag	gtgggaacga	cctgaagaag	gaacttcttg	tactgttagc	
13981	catggaatat	agtctttacc	atgcccttgg	ccacgccoct	ctttaataag	acgggcaatt	
	<i>tnsA</i>						
14041	tgcaattcag	aaaatgaaga	gtttgcttta	gc	cat	aaacaa	aagtccagta
							tgcttttttc

14101 cagcataact ggactgattt cagtttataa ctattctgtc tagtttaaga ctttattgtc
Repetido imperfecto invertido Repetido directo
14161 atagttttaga tctattttgt tcagtttaag actttattgt cgcgccacaa gccctttttt
14221 atctatgata gtgatttactc aaccgtaacc gattttgcc a ggttacgcgg ctgggtcaacg
14281 tcggtgcctt tgatcagcgc gacatggtaa gccagcagct gcagcggaac ggtgtagaag
14341 atcggtgcaa tcacctcttc cacatggcgc atctcgatga tgtgcatgtt atcgctactt
Primer Glms
14401 acaaaacccg catcctgatc ggcgaaagaca tacaactgac cgccacgcgc gcgaacttct
14461 tcaatgttgg atttcagttt ttccaacagt tcggtgttcg gtgcaacgac gataaccggc
14521 atatccgcgt caatcagcgc cagcgggccc tgtttcagct cgccctgcagc gtaggcttca
14581 gcgtgaatgt aagagatctc ttccagcttc aatgcgcctt ccagcgcgat tgggtactga
14641 tcgccacggc ccaggaacag cgcgtgatgt ttgtcagaga aatcttctgc cagagcttca
14701 atgcgtttgt cctgagacag catctgctca atacggctcg gcagcgcctg cagacatgc
14761 acaatgtcat gttcaatgga ggcatccaga ctttcaggc gagacagctt cgccaccagc
14821 atcaacagca cagttaactg agtgggtgaat gcttttagtgg atgccacgcc gatttccgta
14881 cccgcgttgg tcatcagcgc cagatcggat tcgcgcacca gagaagaacc cggaacgtta
14941 cagattgcc a gcgaaccaag gtaaccacgc tctttcgaca gacgcaggcc cgccagggt a
15001 tccgcgggtt cgccagactg tgacaagggtg atcatcaggc tgttacgacg cacggcagat
15061 ttgcgatagc ggaattcaga ggcgatttcg acgtcgcacg gaataacctgc cagcgattca
15121 aaccagtaac gggaaaccat accggagtta taagaagtac cacaggcgag gatctgaata
15181 tgctcaacct tcgacagcag ttcgtcggcg ttcggtccca gctcgcttaa atcaacctga
15241 ccgtggctga tgcgccggt aagggtgttt ttgatcgcgt tcggctgttc gtagatctct
15301 ttctgcatgt agtgacggta aataccttta tcgccgcgt catattgcag attggattcg
15361 atatcctgac gttttacttc cgcgccagtt ttatogaaga tgtttaccga acggcgagta
15421 atttcgcaa tatcgccctc ttcaaggaag ataaagcgac gggtcaccgg cagcagcgcc
15481 agctggctcag aagcgataaa gttttcgccc ataccagac caatcaccag cggactacca
15541 gaacgtgccg ccagcagggg atccgggtga cgggagtcca tgatcactgt accgtacgca
15601 ccacgcagtt gcgggatagc acgcagaaca gcctcagca gagtacgcc ctgtttcagc
15661 tcccagttca ccagatgggc aattacttcg gtgtctgttt cagaaacgaa ggtatagcca
15721 cgcgctttta actcttcgcg cagcggttca tggttttcga tgatgccgtt atgcaccacc
15781 acaatgtgtt cagaaacatg cggatgcgca ttacttctg aagggtcacc gtgggtcgcc
15841 cagcgagtat gagcaatacc cgtaccgcca tgcagaggat gttcttccgc tgccctgagcc

```

15901 agcatctgga ctttaccgag gcgacgcagg cgggtcatat gaccttccgc atcaacaacg
15961 gccagaccgg cagagtcata tccgcggtat tccagacgac gtaaaccttc aagaaggatt
                                           g1mS
16021 tctgctacat cacgttgccg gatcgcgcca acaattccac acatagtttt tgattccgat
16081 ttatatcggt gtcggtcaac ctgtatgccc gttt //

```

Mapa genético del Tn7 (14067 pb) integrado en el cromosoma, en su sitio *attTn7*. Se indica: subrayado en colores, los distintos genes; en negrita, codones de inicio y de terminación para cada gen; **violeta**, repetidos imperfectos invertidos; **rosado**, repetidos directos; **verde**, cebadores. *intI2*, integrasa; *dfrA1*, gen de resistencia a TMP; *sat2*, gen de resistencia a estreptotricina; *aadA1*, gen de resistencia a STR; *orfX*, gen de función desconocida; *tnsE*, *tnsD*, *tnsC*, *tnsB* y *tnsA*, genes para la transposición; *glmS*, gen que codifica para una glucosamina 6- fosfato sintasa.

* Codón stop en *intI2*.

Anexo 3. Resultado del Blast nucleotídico de la secuencia del Tn7 perteneciente a la cepa de *E. coli* AH01.

Description	Accession	
Escherichia coli strain AH01 chromosome, complete genome	CP055251.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli transposon Tn7 DfrA1 (dfrA1) _Sat2 (sat2) _AadA1 (aadA1) _hypothetical protein _TnsE _Tns ...	MN628641.1	
Escherichia coli strain GN02766 chromosome	CP041538.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain PigCaeca_1 chromosome, complete genome	CP039298.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain 28Eco12 chromosome, complete genome	CP038505.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain FDAARGOS_536 chromosome, complete genome	CP033762.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain E-1246 chromosome, complete genome	CP025573.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain 19.1-R1a transposon Tn7, complete sequence, and GlimS (glmS) gene, complete cds	KX159451.1	
Escherichia coli strain 3.5-R3 transposon Tn7, complete sequence	KX117211.1	
Escherichia coli strain 2013C-4465, complete genome	CP015241.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli VE-F5 DNA, complete genome	AP027953.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain MLI109 chromosome, complete genome	CP117008.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain GN02350 chromosome, complete genome	CP095518.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain EC11 chromosome, complete genome	CP060938.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain 623214 chromosome, complete genome	CP091401.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain UPEC-245U/190328 plasmid pEcoUT11f, complete sequence	CP049846.1	●
Escherichia coli strain EC_J_9 chromosome, complete genome	CP075062.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli strain ABW_A19 chromosome, complete genome	CP067307.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RIVM_C029020 chromosome, complete genome	CP068812.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain 18SC05V1.02-EC chromosome, complete genome	CP063736.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli strain US31 chromosome, complete genome	CP048857.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RHBSTW-00219 chromosome	CP055823.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RHBSTW-00176 chromosome, complete genome	CP056800.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli strain RHBSTW-00372 chromosome, complete genome	CP056569.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RHBSTW-00503 chromosome, complete genome	CP056446.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli genomic island AGI-5, strain BEN374	FN666596.1	
Escherichia coli plasmid R721 genomic DNA, complete sequence	AP002527.1	●
Escherichia coli strain RHB41-C01 chromosome, complete genome	CP057007.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli isolate 624 genome assembly, chromosome, main	OW967003.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli strain MLI105 chromosome, complete genome	CP116929.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain 19.1-R1 LpfA (lpfA) gene, complete cds, transposon Tn7 and insertion sequence IS62 ...	KX159450.1	
Escherichia coli strain 101.3 chromosome, complete genome	CP059944.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RH-045-CS chromosome	CP050202.1	
Escherichia coli strain FDAARGOS_1285 chromosome, complete genome	CP070152.1	● <i>fim</i>
Escherichia coli strain RIVM_C018583 chromosome, complete genome	CP068807.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli strain RIVM_C028613 chromosome, complete genome	CP068814.1	● <i>pstS</i>
Escherichia coli O89m:H9 strain MIN11 chromosome, complete genome	CP069666.1	● <i>pstS</i>

Búsqueda acotada a *E. coli*, con 100% de identidad y cobertura. Se muestran las 39 secuencias con sus números de acceso. Con punto **violeta**, Tn7 en localización cromosómica; con punto **verde**, Tn7 en localización plasmídica. Se indica la variante cromosomal a la izquierda del Tn7, *pstS* o *fim*, para los Tn7 de localización cromosómica.

Anexo 4. Resultado del Blast nucleotídico de la secuencia del Int2 de la cepa de *E. coli* AH01

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Escherichia coli strain AH01 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4886157	CP055251.1
✓	Escherichia coli strain SCU-175 plasmid pSCU-175-1, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	124349	CP054380.1
✓	Escherichia coli transposon Tn7 DfrA1 (dfrA1), Sat2 (sat2), AadA1 (aadA1), hypothetical protein, TnsE, TnsD...	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	15973	MN628641.1
✓	Escherichia coli strain SCU-105 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5166012	CP051738.1
✓	Escherichia coli strain 190693 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5151952	CP048934.1
✓	Escherichia coli strain 53 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4884114	CP048359.1
✓	Escherichia coli strain 61 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	7473	100%	0.0	100.00%	4770210	CP048326.1
✓	Escherichia coli strain GN02766 chromosome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5242387	CP041538.1
✓	Escherichia coli strain PigCaeca_1 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4742390	CP039298.1
✓	Escherichia coli strain 28Eco12 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5343367	CP038505.1
✓	Escherichia coli strain FDAARGOS_536 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4977723	CP033762.1
✓	Escherichia coli strain E-1246 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5425761	CP025573.1
✓	Escherichia coli strain AR_0085 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5213052	CP029741.1
✓	Escherichia coli strain 266917_2 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5492922	CP026723.1
✓	Escherichia coli strain MS8345 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	8682	100%	0.0	100.00%	5220976	CP025401.1
✓	Escherichia coli strain 19.1-R1a transposon Tn7, complete sequence; and GlmS (glmS) gene, complete cds	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	16100	KX159451.1
✓	Escherichia coli strain 3.5-R3 transposon Tn7, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	16114	KX117211.1
✓	Escherichia coli strain AHS8C65R1 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5080150	CP125885.1
✓	Escherichia coli strain 2013C-4465, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5428937	CP015241.1
✓	Escherichia coli O2-K1:H4 strain APEC E19019 chromosome, complete genome	Escherichia coli ...	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4917117	CP126937.1
✓	Escherichia coli strain T309-Ta3 plasmid pT309-Ta3_3, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	52047	CP128258.1
✓	Escherichia coli strain ETEC6334 plasmid unnamed2, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	115204	CP122606.1
✓	Escherichia coli strain ETEC6333 plasmid unnamed2, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	109229	CP122602.1
✓	Escherichia coli strain ETEC1706 plasmid unnamed12, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	266050	CP122916.1
✓	Escherichia coli VE-F5 DNA, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4809972	AP027953.1
✓	Escherichia coli strain ML105 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4603416	CP116929.1
✓	Escherichia coli strain ML109 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5217379	CP117008.1
✓	Escherichia coli strain GN02350 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5215336	CP095518.1
✓	Escherichia coli strain GwaEC345 plasmid pEC345, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	109373	CP094198.1
✓	Escherichia coli strain EC11 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4798689	CP060938.1
✓	Escherichia coli strain EC_528 plasmid pME5, partial sequence	Escherichia coli	5999	6399	100%	0.0	100.00%	194464	MT868879.1
✓	Escherichia coli strain 623214 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5323098	CP091401.1
✓	Escherichia coli strain 542093 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5145154	CP091409.1
✓	Escherichia coli strain STO_Bone1B chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4832047	CP054169.1
✓	Escherichia coli strain UPEC-245U/190328 plasmid pEcoUT11f, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	109478	CP049846.1
✓	Escherichia coli strain UPEC-245U/190328 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5016451	CP049845.1
✓	Escherichia coli strain EC_J_9 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4948775	CP075062.1
✓	Escherichia coli strain ABW_A19 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5250599	CP067307.1
✓	Escherichia coli O89m:H9 strain MIN11 chromosome, complete genome	Escherichia coli ...	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4768306	CP059666.1
✓	Escherichia coli strain FDAARGOS_1300 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5171181	CP069996.1
✓	Escherichia coli strain FDAARGOS_1302 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4986352	CP069935.1
✓	Escherichia coli strain FDAARGOS_1248 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4919415	CP069542.1
✓	Escherichia coli strain FDAARGOS_1256 plasmid unnamed, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	109644	CP069452.1
✓	Escherichia coli strain RIVM_C018583 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5419042	CP068807.1
✓	Escherichia coli strain RIVM_C028613 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5385668	CP068814.1
✓	Escherichia coli strain RIVM_C030371 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5348975	CP068827.1
✓	Escherichia coli strain RIVM_C029020 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5251089	CP068812.1

☒ Escherichia coli strain 18SC05VL02-EC chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5156783	CP063736.1
☒ Escherichia coli THO-010 DNA, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4963168	AP022540.1
☒ Escherichia coli strain RM-096-MS chromosome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	7052108	CP050218.1
☒ Escherichia coli strain RM-096-CS chromosome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	6654931	CP050217.1
☒ Escherichia coli strain RH-045-CS chromosome	Escherichia coli	5999	7019	100%	0.0	100.00%	7622298	CP050202.1
☒ Escherichia coli strain 101.3 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4634466	CP059944.1
☒ Escherichia coli strain US31 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5201875	CP048857.1
☒ Escherichia coli strain RHBSTW-00219 chromosome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5021861	CP055923.1
☒ Escherichia coli strain RHB41-C01 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	4611954	CP057007.1
☒ Escherichia coli strain RHBSTW-00176 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5237504	CP056800.1
☒ Escherichia coli strain RHBSTW-00372 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	5206754	CP056569.1
☒ Escherichia coli strain RHBSTW-00503 chromosome, complete genome	Escherichia coli	5999	7453	100%	0.0	100.00%	4895183	CP056446.1
☒ Escherichia coli genomic island AGI-5, strain BEN374	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	93971	FN666596.1
☒ Escherichia coli strain K-100 plasmid IncF::IncLM class 2 integron, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	3373	HM043577.1
☒ Escherichia coli plasmid R721 genomic DNA, complete sequence	Escherichia coli	5999	5999	100%	0.0	100.00%	75582	AP002527.1
☒ Escherichia coli isolate 624 genome assembly, chromosome, main	Escherichia coli	5915	6009	100%	0.0	100.00%	5213381	OW967003.1
☒ Escherichia coli strain ESBL3203 plasmid pESBL3203-IncF, complete sequence	Escherichia coli	5860	6007	100%	0.0	100.00%	61068	MW390528.1
☒ Escherichia coli strain 19.1-R1 LpIA (lpA) gene, complete cds; transposon Tn7 and insertion sequence IS629...	Escherichia coli	5267	6009	100%	0.0	100.00%	18176	KX159450.1

Búsqueda acotada a *E. coli* con 100% de identidad y de cobertura. Se muestran las 65 secuencias portadoras de un Int2 completo.