



Martino, Florencia

Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias clínicas : caracterización de nuevos genes y análisis de plásmidos portadores



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Martino, F. (2023). *Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias clínicas: caracterización de nuevos genes y análisis de plásmidos portadores. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3991>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias clínicas: caracterización de nuevos genes y análisis de plásmidos portadores

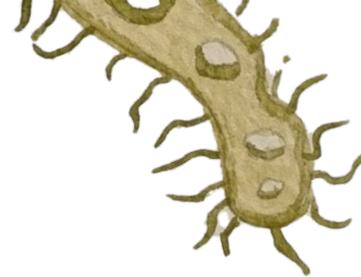
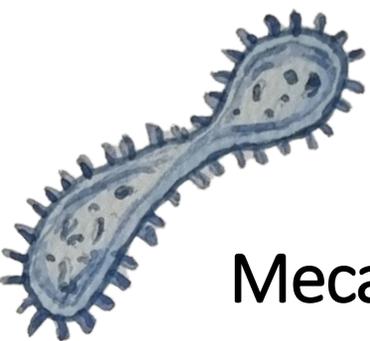
TESIS DOCTORAL

Florencia Martino

florenmartino@gmail.com

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública que ejerce una enorme presión sobre los sistemas de salud. Una consecuencia preocupante del incremento de la resistencia a los antimicrobianos es la emergencia y diseminación de gérmenes panresistentes. La diseminación horizontal de mecanismos de resistencia juega un papel fundamental en esta problemática y la comprensión de su funcionamiento es clave para establecer estrategias que permitan su contención. En esta tesis se estudiaron mecanismos plasmidicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias de origen clínico y los elementos genéticos móviles asociados. Se construyó una plasmoteca con la secuencia completa de 42 plásmidos portadores de PMQRs y se analizaron a nivel molecular mediante herramientas bioinformáticas.



Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias clínicas: caracterización de nuevos genes y análisis de plásmidos portadores

Tesis doctoral

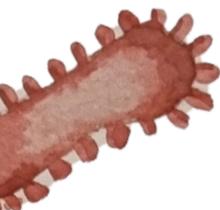
Lic. Florencia Martino

Director: Dr. Alejandro Petroni

Codirector: Dr. Diego F. Faccone



*Servicio de Antimicrobianos - Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas -
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos C. Malbrán"-*



Agradecimientos

Agradezco a mi papá Carlos y a mi mamá Laura, no tengo palabras para expresar el agradecimiento por el amor y apoyo incondicional que siempre me dieron. A Juan, mi copiloto de la vida, por quererme así y transmitirme su calma en mis días complicados. A Cony, mi hermana y mi todo, que nunca se perdió un detalle del proceso de esta tesis y siempre es mi apoyo incondicional. A los hermanos que elegí, Juanma que con sus comentarios positivos puede motivar a lo imposible, y a Viki, que me agrandó el corazón tres veces. A mi Nona, ella tiene mucho que ver que en mi interés y mi forma de ver la ciencia. A mis amigos Charly, Giulis, Belén y Julia no sé cómo se dan cuenta, pero me envían dosis de entusiasmo justo cuando las necesito. También a Olga y Galina, por mantener mi cuerpo flexible y sano para poder soportar el peso de una tesis. Además, el estereotipo del científico trabajando en un sótano, sin contacto con personas y esperando que las ideas surjan por generación espontánea, está muy alejada de la realidad. En cambio, esta tesis es una muestra más de que el conocimiento científico se construye a través de la participación y el aporte conjunto de un equipo de personas e instituciones. El trabajo de esta tesis tiene las huellas de un montón de personas y es el resultado de un esfuerzo colectivo, en especial de los integrantes del servicio antimicrobianos. Por esta razón, quisiera agradecer el arduo trabajo de Alejandro Petroni, quien dirigió esta tesis con incansable e infinito detalle. A mi codirector Diego Faccone, que junto con Alejandra Corso son la columna vertebral del laboratorio, permitiendo que se mantenga en pie todos los días. A Denise DeBelder, quien me enseñó todo lo que debe (y no debe) suceder en la mesada de un laboratorio de microbiología. A Ezequiel Albornoz que me transmitió sus conocimientos científicos del proyecto sin usar un sólo cuaderno. A Roberto Melano, sus contribuciones fueron piezas fundamentales para esta tesis. A Ezequiel Tuduri, siempre dispuesto a instalar algún programa, o resolver nuestros conflictos tecnológicos. A Stella, mi confidente durante todo el proceso y Sonia, que me abrió la puerta del laboratorio y la investigación. A Belén, Ale, Juan y Maru con ellos encontré una amistad dentro del laboratorio y siempre encontramos una razón más para festejar. A Paula, Paola, Meli, Fer, Yanina, Lau y Cele me considero una afortunada por trabajar con todos ustedes.

Por último, quisiera expresar mi agradecimiento a las siguientes prestigiosas instituciones por brindarme la oportunidad de formar parte de ellas, su apoyo durante mi trabajo de investigación y su contribución al avance del conocimiento científico. En primer lugar, al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) "Dr. Carlos G. Malbrán" y a la Unidad de Genómica del ANLIS Malbrán, por proporcionarme las instalaciones necesarias para realizar el trabajo experimental y soporte técnico indispensables. También, al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento de las becas que permitieron el desarrollo de esta investigación. Finalmente, a la Universidad Nacional de Quilmes por brindarme la formación académica necesaria para llevar adelante este trabajo de investigación.

Indice

Indice de figuras	10
Indice de tablas	13
Publicaciones.....	15
Abreviaturas y Aclaraciones.....	15
1 Introducción.....	15
Sección 1.01 Enterobacteriales.....	15
Sección 1.02 Resistencia a los antimicrobianos	15
Sección 1.03 Transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles asociados: bacteriófagos y plásmidos	17
(a) Transferencia Horizontal.....	17
(b) Clasificación de plásmidos mediante grupos de incompatibilidad.....	20
Sección 1.04 Otros elementos genéticos móviles.....	27
(a) Secuencias de inserción: generalidades y clasificación.....	27
(b) Secuencias de inserción: la relevante familia IS26.....	29
(c) Transposones.....	34
(d) Sistema integrón/casete	36
(e) Clasificación de los Integrones.....	39
Sección 1.05 Mobiloma y su rol en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos	43
Sección 1.06 Recombinación Homóloga	44
Sección 1.07 CRISPR-Cas	47
Sección 1.08 Quinolonas: estructura, mecanismo de acción y uso terapéutico	50
(a) Estructura química.....	50
(b) Mecanismo de acción y uso clínico.....	52
Sección 1.09 Mecanismos cromosómicos de resistencia a las quinolonas.....	53
Sección 1.10 Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas o PMQRs	54
(a) Clases de PMQRs.....	55
(b) Eficacia terapéutica y relevancia clínica de los PMQRs.....	57
Sección 1.11 Epidemiología molecular de los PMQRS y antecedentes en Argentina	58

(a)	Genes <i>qnr</i>	58
(b)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	63
(c)	<i>qepA</i>	64
(d)	<i>oqxAB</i>	65
Sección 1.12	Antecedentes y relevancia del tema de estudio de esta tesis	66
2	Objetivos	68
	Objetivo General I:	68
	Objetivos específicos:	68
	Objetivo General II:	68
	Objetivos específicos:	68
3	Materiales y métodos	70
Sección 3.01	Aislamientos clínicos de enterobacterias	70
Sección 3.02	Sensibilidad a los antimicrobianos	71
Sección 3.03	Conjugaciones biparentales	72
Sección 3.04	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
Sección 3.05	Secuenciación por Sanger	73
Sección 3.06	Endonucleasa S1 y perfil plasmídico	74
Sección 3.07	Extracción y Secuenciación Masiva (NGS) de ADN	74
(a)	Secuenciación por Illumina	76
(b)	Secuenciación por Oxford Nanopore Technologies (ONT)	76
Sección 3.08	Análisis bioinformático	77
(a)	Control de calidad de las lecturas de Illumina	77
(b)	Control de calidad de las lecturas de Nanopore	82
(c)	Identificación de la especie	82
(d)	Identificación de genes de RAM a partir de lecturas cortas de Illumina	82
(e)	Ensamblados de novo	83
(f)	Búsqueda de homólogos de genes PMQR	84
(g)	Análisis de secuencias de plásmidos portadores de genes PMQR	86
(h)	Comparación, alineamiento y visualización gráfica de secuencias	89
Sección 3.09	Análisis de datos estadísticos y visualización	90
4	Resultados Objetivo I	92

(a)	Identificación de <i>qnrE</i>	94
(b)	Secuenciación y análisis bioinformático de aislamientos portadores de <i>qnrE</i>	96
(c)	Búsqueda de nuevos PMQRs mediante conjugación biparental	97
(d)	Búsqueda bioinformática de nuevos PMQRs.....	97
5	Resultados Objetivo II	100
Sección 5.01	Selección de aislamientos	100
Sección 5.02	Conjugaciones biparentales.....	102
Sección 5.03	Perfil plasmídico por endonucleasa S1	104
Sección 5.04	Secuenciación masiva de ADN	108
Sección 5.05	Análisis de plásmidos portadores de genes PMQR	110
(a)	Identificación de los plásmidos portadores de genes PMQR.....	110
(b)	Coselección de genes PMQRs y otros genes de RAM	116
(c)	Tipificación de plásmidos.....	119
(d)	Secuencias de Inserción.....	122
(e)	Secuencias de inserción y transposones de la familia Tn3.....	124
(f)	Integrones.....	124
(g)	CRISPR.....	124
Sección 5.06	Análisis de los entornos genéticos de PMQRs y plásmidos portadores.....	125
(a)	<i>oqxAB</i>	125
(b)	<i>qnrA1</i>	128
(c)	<i>qnrB1</i>	129
(d)	<i>qnrB2</i>	131
(e)	<i>qnrB4</i> y <i>qnrB52</i>	135
(f)	<i>qnrB10</i>	139
(g)	<i>qnrB19</i>	145
(h)	<i>qnrS1</i>	147
(i)	<i>qnrE1</i>	149
(j)	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	153
Sección 5.07	Rearreglos genómicos complejos entre plásmidos.....	163
(a)	Plásmido fusión pEco_M9902_127.....	164
(b)	Plásmido fusión pKpn_Q4016_381.....	171

(c)	Origen de los integrones twin con <i>qnrB10</i> y <i>bla</i> _{CTX-M-2}	173
(d)	Rearreglos genómicos complejos en el plásmido portador de genes PMQRs de <i>K. variicola</i> M7943	175
6	Conclusiones y perspectivas	183
7	Referencias bibliográficas	184
Anexo	196

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de RAM en bacterias. _____	17
Figura 2. Mecanismo de conjugación biparental. _____	19
Figura 3. Componentes de una secuencia de Inserción. _____	28
Figura 4. Mecanismos de transposición conservativa y replicativa. _____	29
Figura 5. Mecanismos de transposición de IS26. _____	30
Figura 6. Cointegración replicativa clásica. _____	31
Figura 7. Transposición intramolecular. _____	31
Figura 8. Transposición de un pseudo-transposón compuesto. _____	32
Figura 9. Mecanismos de generación de unidades translocables. _____	33
Figura 10. Mecanismo de targeted transposition (no replicativo). _____	34
Figura 11. Estructura de un transposón compuesto.. _____	35
Figura 12. Estructura del Tn3. _____	35
Figura 13. Estructura del Tn1331. _____	36
Figura 14. Estructura de un integrón e integración de casetes mediante recombinación homóloga sitio-específica. _____	38
Figura 15. Estructura de los integrones _____	40
Figura 16. Modelo de Toleman que explica el origen de integrones de clase 1 complejos (ICC1). _____	42
Figura 17. Componentes del mobiloma en el Genoma Principal (cromosoma). _____	43
Figura 18. Diferentes elementos genéticos móviles y su rol en la movilidad inter- e intracelular de genes de resistencia a los antimicrobianos. _____	44
Figura 19. Mecanismo de recombinación homóloga. _____	46
Figura 20. Estructuras resultantes de recombinación homóloga inter- e intramolecular. _____	47
Figura 21. Elementos de un sistema CRISPR-Cas. _____	48
Figura 22. Etapas del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas. _____	48
Figura 23. Región CRISPR-Cas tipo IV encontrada en un plásmido de Enterobacterales. _____	49
Figura 24. Distribución de plásmidos portadores de sistemas CRISPR-Cas. _____	50
Figura 25. Estructura molecular básica de las quinolonas. _____	51
Figura 26. Entornos genéticos para diferentes genes de qnr. _____	59
Figura 27. Entornos genéticos de <i>qnrB19</i> . _____	61
Figura 28. Esquema evolutivo de Tn6238. _____	64
Figura 29. Entorno genético <i>oqxAB</i> en pOLA52. _____	65
Figura 30. Flujo de trabajo utilizado para el análisis bioinformático de los plásmidos portadores de PMQRs. _____	75
Figura 31. Control de calidad de las secuencias mediante FastQC. _____	78
Figura 32. Composición de la secuencia por base a lo largo de la lectura. _____	79

Figura 33. Distribución del contenido de %GC de las lecturas obtenidas. _____	80
Figura 34: Distribución del largo de las secuencias obtenidas en la secuenciación. _____	80
Figura 35. Distribución de secuencias por grado de duplicación. _____	81
Figura 36. Reporte de la herramienta FastQC para el análisis de Secuencias sobrerrepresentadas. _____	81
Figura 37. Visualización de un mapeo inverso de lecturas largas de ONT. _____	89
Figura 38. Comparación entre diferentes alelos de la familia <i>qnrE</i> y sus proteínas inferidas. ___	95
Figura 39. Comparación de entornos genéticos de alelos <i>qnrE</i> cromosómicos y plasmídicos. ___	96
Figura 40. Dominios PF00805 y PF13599 detectados en todas las proteínas Qnr. _____	99
Figura 41. Esquema para la selección de cepas para la plasmoteca. _____	101
Figura 42. Secuenciación de las 42 cepas de la plasmoteca. _____	109
Figura 43. Composición final de la plasmoteca luego de establecer la localización de cada gen. _____	111
Figura 44. Correlación lineal entre el tamaño de plásmido estimado por endonucleasa S1 y el obtenido por NGS (n=41). _____	115
Figura 45. Genes de RAM detectados en los plásmidos portadores de genes PMQRs. _____	119
Figura 46. Distribución de grupos de plásmidos de la plasmoteca. _____	119
Figura 47. Grupos de plásmidos detectados en la plasmoteca y densidad de IS. _____	121
Figura 48. Cantidad de ISs encontradas en cada plásmido portador de PMQRs. _____	122
Figura 49. Ocurrencia de familias de ISs en la plasmoteca. _____	125
Figura 51. Localización de <i>oqxAB</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i> Q4160 y comparación con su localización en pOLA52. _____	127
Figura 52. Entorno genético de <i>qnrA1</i> en pEcl_M17464_274. _____	130
Figura 54. Entorno genético de <i>qnrB1</i> en común entre los tres plásmidos (pKpnM9863_183, pKpnM21014_175 y pPstM22246_146). _____	131
Figura 55. Integrones portadores de <i>qnrB2</i> . _____	132
Figura 56. Modelo de recombinación homóloga que daría origen al integrón twin con dos copias de <i>qnrB2</i> . _____	134
Figura 57. IS26-bounded resistance gene cluster conteniendo <i>qnrB4</i> . _____	136
Figura 58. Comparación de pKqsq_M17277_477 con los diez plásmidos de NCBI-BD con mayor identidad mediante BRIG. _____	137
Figura 59. Comparación de pKqsq_M17277_123 con los cinco plásmidos de NCBI-BD con mayor identidad mediante BRIG. _____	138
Figura 60. Comparación del ICC1 del pKqsq_M17277_123 con NCBI-BD. _____	139
Figura 61. In37::ISCR1:: <i>qnrB10</i> . _____	140
Figura 62. Comparación de los plásmidos del grupo HI portadores de <i>qnrB10</i> . _____	142
Figura 63. Región común entre los cinco plásmidos portadores de <i>qnrB10</i> en un ICC1 incompleto. _____	142

Figura 64. Comparación entre los plásmidos portadores de <i>qnrB10</i> y <i>bla</i> _{CTX-M-2} en un ICC1 twin.	144
Figura 65. Integrón twin portador de <i>qnrB10</i> y <i>bla</i> _{CTX-M-2} encontrado en pKpn_M9314_63.	145
Figura 66. Comparación entre los plásmidos pEco_M9820_36 de y pEco_M11059_31 portadores de <i>qnrB19</i> .	146
Figura 67. Comparación de los plásmidos portadores de <i>qnrS1</i> .	148
Figura 68. Entorno genético de los genes <i>qnrS1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr5</i> del plásmido pKpn_M9932_55.	149
Figura 69. Comparación entre todos los plásmidos portadores de <i>qnrE1</i> .	150
Figura 70. Comparación de los transposones derivados de <i>ISEcp1</i> que contienen <i>qnrE1</i> .	152
Figura 71. Tn6238 encontrados en los diferentes plásmidos.	156
Figura 72. Alineamiento de pEcl_Q5005_56 con Tn6238.	157
Figura 73. Alineamiento de Tn6238 con una pKpn_M21692_150.	158
Figura 74. Alineamiento del Tn6238 con pKpn_M9992_73.	158
Figura 75. Alineamiento de Tn6238 con pEco_Q4134_62.	159
Figura 76. Alineamiento de los tres plásmidos portadores de <i>aac(6')-Ib-cr5</i> en integrón simple.	161
Figura 77. Comparación del In37:: <i>ISCR1</i> :: <i>qnrB10</i> con la estructura de los casetes <i>aac(6')-Ib-cr5</i> , <i>bla</i> _{OXA-1} y Δ catB3 flanqueada por IS26, encontrada en cinco plásmidos de la plasmoteca.	163
Figura 78. Alineamiento entre los plásmidos pKox_Q4020_53 y pKpn_M9306_90 que se encuentran relacionados con el plásmido híbrido pEco_M9902_127.	166
Figura 79. Modelo de rearrreglos genómicos que podrían dar lugar a pEco_M9902_127, pC15-1a y pKpn_M9306_90.	168
Figura 80. Alineamiento entre los plásmidos pKpn_M9306_90 y pKpn_M9828_138.	170
Figura 81. Alineamiento entre los plásmidos pKpn_Q1211_174, pPst_M22246_146 y pKpn_Q4016_381.	172
Figura 82. Modelo del origen de los integrones twin.	174
Figura 83. Alineamiento entre pKva_M7943_60, pM9216_A_A2_65 y pKva_M7943_384.	176
Figura 84. Alineamiento entre los plásmidos pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65.	177
Figura 85. Modelo de recombinación homóloga entre las dos copias de IS26 que daría lugar a la diferencia entre pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65.	178
Figura 86. Modelo que explica los rearrreglos genómicos que darían lugar a pKva_M7943_60.	179
Figura 87. Modelo que explica los dos rearrreglos genómicos que darían lugar a entre pM9216_A_A2_65.	180

Indice de Tablas

Tabla 1. Cantidad de plásmidos por grupo incluidos en PLSDB (diciembre 2022).	22
Tabla 2. Subgrupos de plásmidos HI definidos según la combinación de replicasas. Se muestran las dos clasificaciones principales de subgrupos HI.....	24
Tabla 3. Clasificación de quinolonas según su espectro de actividad y sus características generales.....	52
Tabla 4. Cebadores utilizados para las PCRs ensayadas en esta tesis.	73
Tabla 5. Datos epidemiológicos de los 46 aislamientos con fenotipos PMQRs.	92
Tabla 6. Primers diseñados para amplificar la familia <i>qnrE</i>	94
Tabla 7. Datos epidemiológicos de los 40 aislamientos seleccionados para la plasmoteca.	103
Tabla 8. Perfiles plasmídicos de aislamientos clínicos parentales y de su/s respectiva/s transconjugante/s.	104
Tabla 9. Métricas de la secuenciación por ONT.....	110
Tabla 10. Identificación y denominación de los plásmidos obtenidos por NGS.....	112
Tabla 11. Plásmidos portadores de <i>qnrB10</i>	140
Tabla 12. Plásmidos portadores de <i>aac(6')-Ib-cr</i>	154
Tabla 13. Resultados obtenidos por endonucleasa S1 y NGS para el aislamiento clínico M7943 y sus transconjugantes TC-M9216 y TC-M23825.	175

Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis se publicaron en revistas científicas o eventos científicos y se adjuntan en el Anexo:

Publicaciones

Faccione*, D., Martino*, F., Albornoz, E., Gomez, S., Corso, A., & Petroni, A. (2020). Plasmid carrying *mcr-9* from an extensively drug-resistant NDM-1-producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* clinical isolate. *Infection, genetics and evolution*, 81, 104273. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104273>. *Igual contribución.

Martino, F., Tijet, N., Melano, R., Petroni, A., Heinz, E., De Belder, D., Faccione, D., Rapoport, M., Biondi, E., Rodrigo, V., Vazquez, M., Pasteran, F., Thomson, N. R., Corso, A., & Gomez, S. A. (2019). Isolation of five *Enterobacteriaceae* species harbouring *bla*_{NDM-1} and *mcr-1* plasmids from a single paediatric patient. *PLoS one*, 14(9), e0221960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221960>

Congresos

Martino, F., Tijet, N., Poklópovich, T., Campos, J., Corso, A., Melano, R., & Petroni, A. (2021). A fusion plasmid harboring *bla*_{CTXM-15} and *qnrB2* isolated from a clinical *Escherichia coli*: the multiresistant outcome of multiple complex genomic rearrangements between two conjugative plasmids. En XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 25-28 de agosto de 2021, Asunción, Paraguay.

Martino, F., Tijet, N., Poklópovich, T., Campos, J., Corso, A., Melano, R., & Petroni, A. (2021). Novel complex class 1 integron carrying *qnrB10* and *bla*_{CTX-M-2} in a twin variable region 2 found in a clinical *Citrobacter freundii* from Argentina. En XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 25-28 de agosto de 2021, Asunción, Paraguay.

Martino, F., De Belder, D., Viso N., Fernández F., Farber M., Corso A., & Petroni A. (2019). Genes transferibles de resistencia a quinolonas, *qnrB4* y *qnrB52*: primer reporte en Argentina y análisis de sus megaplásmidos portadores. En XV Congreso Argentino de Microbiología, 25-27 de septiembre de 2019, Buenos Aires, Argentina.

Martino, F., Albornoz, E., Tijet, N., Melano, R., Corso, A., & Petroni, A. (2018). Caracterización de genes *qnrE* en enterobacterias clínicas de Argentina y descripción de un nuevo alelo, *qnrE7*. En VIII Congreso Argentino de Microbiología, 6-8 de noviembre de 2018, Buenos Aires, Argentina.

Esta tesis se puede visualizar mediante la versión en línea en:

Abreviaturas y Aclaraciones

3'CS: secuencia conservada 3' (del inglés: *3' conserved sequence*)

5'CS: secuencia conservada 5' (del inglés: *5' conserved sequence*)

ACT: *Artemis Comparative Tool*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTn: BLAST para alineamiento de ácidos nucleicos

BLEE: β-lactamasa de espectro extendido. Plural: BLEEs

BRIG: *BLAST Ring Image Generator*

CALIN: *attCs* agrupados que carecen de integrasa de integrón (del inglés: *Clusters of attCs lacking an integron-integrase*).

CIM: concentración inhibitoria mínima

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CPM: concentración preventiva de mutantes

CR: región común (del inglés: *Common region*) de los integrones de clase 1 complejos, posteriormente denominada *ISCR1*

CRISPR-Cas: del inglés: *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats* (CRISPR), y *CRISPR-associated protein* (Cas)

CRISPR-Cas-IV: sistema CRISPR-Cas tipo IV

EGM: elemento genético móvil

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HMM: *Hidden Markov Model*. Plural: HMMs

IC1: integrón de clase 1. Plural: IC1s

ICC1: integrón de clase 1 complejo. Plural: ICC1s

ICE: elemento integrativo y conjugativo (del inglés: *Integrative and conjugative element*). Plural: ICEs

IR: repetición invertida (del inglés: *Inverted Repeat*), extremo de elementos transponibles. Plural: IRs

IRL: IR izquierda (del inglés: *IR Left*). Plural: IRLs

IRR: IR derecha (del inglés: *IR Right*). Plural: IRRs

IS: secuencia de inserción. Plural: ISs

ISCR: IS con regiones comunes (del inglés: *IS with common regions*). Plural: ISCRs

MDR: multirresistencia a drogas (del inglés: *multidrug resistance*)

MITE: elemento transponible con IR, en miniatura (del inglés: *Miniature inverted repeat transposable element*). Plural: MITEs

MLST: tipificación multilocus de secuencias (del inglés: *Multilocus Sequence Typing*)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NCBI-BD: base de datos *Nucleotide Collection (nr/nt)* de NCBI

NGS: secuenciación masiva de nueva generación (del inglés: *Next Generation Sequencing*)

QRDR: región determinante de la resistencia a quinolonas (del inglés: *Quinolone resistance determining region*). Plural: QRDRs

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMV: vesículas de membrana externas (del inglés: *Outer Membrane Vesicles*). Plural: OMVs

ORF: marco de lectura (del inglés: *Open Reading Frame*). Plural: ORFs

PDR: panresistencia a drogas (del inglés: *pandrug resistance*)

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado (del inglés: *Pulsed-field gel electrophoresis*)

PLSDB: base de datos de plásmidos bacterianos (del inglés: *Plasmid Database*)

PMQR: resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (del inglés: *Plasmid-mediated quinolone resistance*). Plural: PMQRs

RAM: resistencia a los antimicrobianos

SNP: polimorfismo de nucleótido simple (del inglés: *Single nucleotide polymorphism*). Plural: SNPs

T4CP: proteína de acoplamiento tipo IV (del inglés: *Type IV coupling protein*)

T4SS: sistema de secreción tipo IV (del inglés: *Type IV secretion system*)

TSD: duplicación del sitio blanco (inserción) de una IS (del inglés: *Target site duplication*)

UT: unidad translocable. Plural: UTs

Vr-1: región variable 1 de un ICC1, correspondiente a la región de casetes

Vr-2: región variable 2 de un ICC1, localizada entre *ISCR1* y *3'CS2*

WGS: secuenciación de genoma completo (del inglés: *Whole genome sequencing*)

XDR: resistencia extendida a drogas (del inglés: *extensive drug resistance*)

Introducción

"No hay progreso ni desarrollo posible sin un conocimiento profundo de las condiciones en que vive el pueblo."

- Ramón Carrillo

1 Introducción

Sección 1.01 Enterobacterales

Las bacterias pertenecientes al orden Enterobacterales, constituyen el grupo de bacterias con mayor impacto en la salud pública. Son reconocidas por el gran impacto que tiene su biología celular y molecular, estructura y función de genes en la patogenicidad microbiana. El orden Enterobacterales se encuentra clasificado dentro del dominio Bacteria, filo Proteobacteria y clase γ -Proteobacteria. Las familias incluidas dentro de este orden fueron modificadas recientemente gracias a estudios realizados por secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Las familias incluidas actualmente son: *Budviciaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae* y *Yersiniaceae*. Las bacterias pertenecientes a *Enterobacteriaceae* son Gram negativas, bacilos anaerobios facultativos que no forman esporas. En esta familia se incluyen géneros de patógenos conocidos, por ejemplo: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella*.¹

Por otra parte, otros géneros de aislamientos clínicos incluidos en esta tesis, como *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*, que son patógenos humanos oportunistas, antiguamente pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, pero actualmente están incluidos en la familia *Morganellaceae*. Las bacterias de esta familia son Gram negativas y dan resultados negativos para las pruebas de oxidasa, arginina decarboxilasa y Voges–Proskauer.¹

Sección 1.02 Resistencia a los antimicrobianos

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 revolucionó la medicina moderna, brindando una oportunidad para el tratamiento de las infecciones bacterianas y permitiendo así salvar millones de vidas. Desde ese momento y gracias al extenso uso de diversas drogas antimicrobianas, las bacterias fueron adquiriendo la capacidad de resistir a una amplia variedad de agentes que podrían impedir su crecimiento.^{2, 3} En su mayoría, los antimicrobianos son producidos naturalmente por hongos y bacterias que coexisten compartiendo nichos ecológicos entre sí, por lo que desarrollan mecanismos de resistencia a esos mismos compuestos para poder subsistir.² El desarrollo de resistencia ocurre a nivel genético, ya sea por mutaciones o por adquisición de nuevos genes de resistencia a través de mecanismos de intercambio genético. La evolución de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se acelera por el uso excesivo y mal uso de antibióticos en medicina, veterinaria y sectores agrícolas ya que generan un aumento en la presión de selección.⁴ La RAM resulta en una reducción de la eficacia de las drogas conocidas para el tratamiento de las infecciones bacterianas, aumentando los costos y limitando

las opciones de tratamiento. El impacto es mayor en los pacientes más vulnerables, dando como resultado una mayor morbilidad y mortalidad.⁵

Las estadísticas muestran que la RAM representa actualmente una amenaza para la salud pública, proyectando que para el 2050, se perderán 10 millones de vidas al año, ocasionando un gasto anual de 100 trillones de dólares, si no se toman medidas al respecto.⁶ Con estas perspectivas, las infecciones bacterianas ya no podrán tratarse con los antibióticos disponibles, o deberán utilizarse alternativas que estaban en desuso debido a su toxicidad (como sucede actualmente con el uso de las polimixinas).^{2,3,7}

Existe un consenso establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para definir categorías de los diferentes fenotipos de RAM. Se estableció que, un aislamiento bacteriano tiene multirresistencia (MDR) cuando es no sensible a, al menos, un antibiótico de cada una de 3 o más familias de antibióticos. En cambio, el aislamiento tiene resistencia extendida (XDR) cuando es resistente a, al menos, un antibiótico en todas las familias de antibióticos, excepto una o dos. Por último, un aislamiento tiene panresistencia (PDR), cuando muestra no sensibilidad a todos los antibióticos de uso clínico. En estas definiciones no se tienen en cuenta las resistencias intrínsecas naturales de los aislamientos.^{2,8}

El incremento de la RAM es una amenaza para la salud pública a nivel mundial. Los mecanismos que generan RAM en una bacteria se resumen en la Figura 1. Existen dos formas por las cuales los diferentes mecanismos de RAM pueden diseminarse entre las bacterias: a) la transmisión vertical, que involucra la herencia del material genético total en las dos células hijas que provienen de la división de una célula madre (no se abordará en esta tesis), y (b) la transferencia horizontal de genes, que consiste en el movimiento de parte del material genético entre células que no provienen de una misma célula madre, o que incluso pueden ser de distinta especie, género, familia, orden, etc. y que se detalla a continuación.⁹

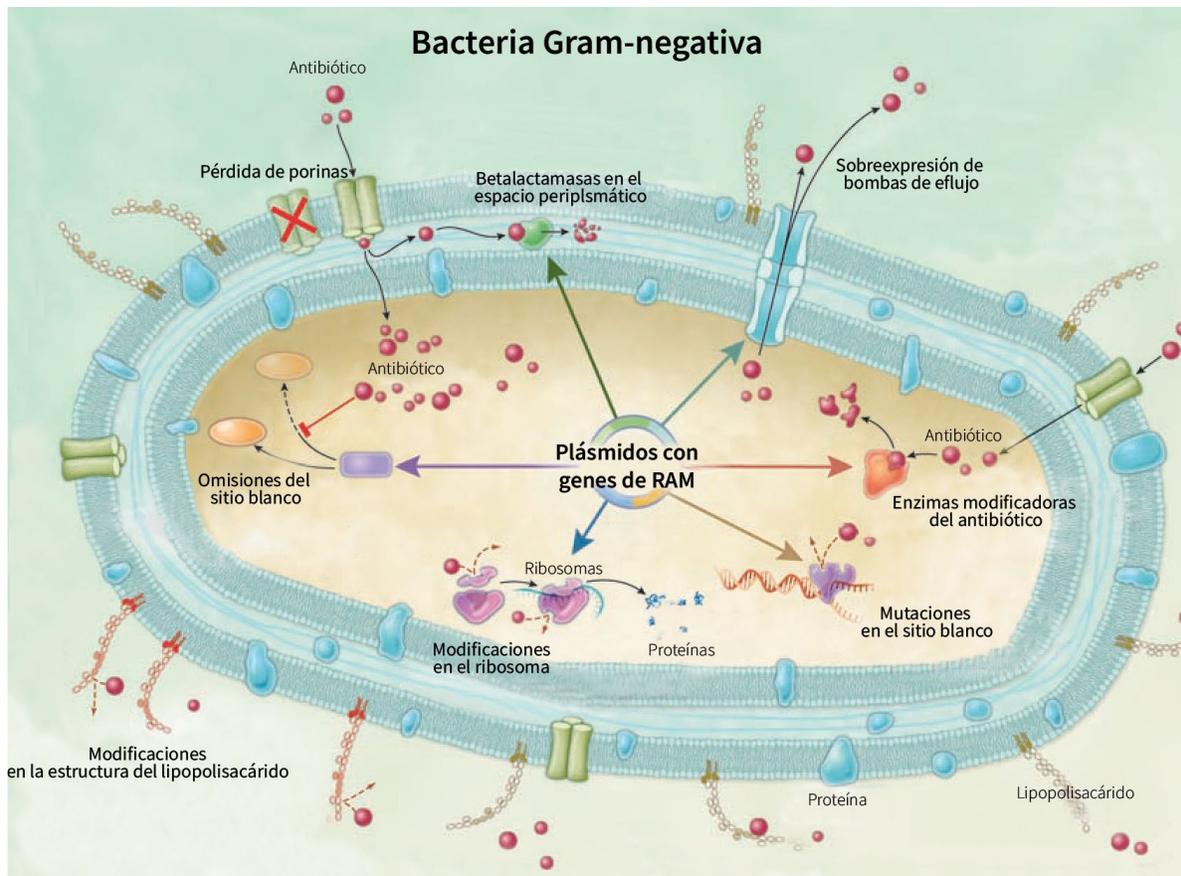


Figura 1. Mecanismos de RAM en bacterias. En esferas rojas se representan los antibióticos. Los mecanismos se representaron codificados en plásmidos, pero pueden estar presentes también en cromosomas e incluyen: 1) Disminución de la concentración intracelular del ATB: incluye disminución permeabilidad (pérdida de porinas) y adquisición, o sobreexpresión de bombas de eflujo 2) Mutaciones en el sitio blanco de la droga, que no le permiten que se una al mismo o modificaciones en el ribosoma que impiden que el antibiótico se una al mismo e inhiba la síntesis proteica; 3) Protección del sitio blanco, 4) Modificación o degradación enzimática del antibiótico. Esquema adaptado de referencia⁹

Sección 1.03 Transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles asociados: bacteriófagos y plásmidos

(a) Transferencia Horizontal

La transferencia horizontal se puede dar mediante 4 mecanismos:

1) La transformación, en la cual una célula en un estado fisiológico denominado competencia, capta ADN que se encuentra libre en el medio extracelular.¹⁰

2) Un tipo específico de transformación, mediado por vesículas que se liberan de la membrana externa bacteriana (OMV, por *outer membrane vesicles*). Las OMVs son vesículas

esféricas de 50 a 250 nm de diámetro, constituidas por una membrana de dos capas lipídicas, que se producen naturalmente en bacterias Gram negativas, y que pueden transportar moléculas de ADN.¹¹

3) La transducción, mediada por bacteriófagos capaces de empaquetar ADN exógeno de una célula dadora y transferirlo a otra aceptora durante el subsiguiente ciclo de infección. Los bacteriófagos (o fagos) son una de las entidades biológica más abundantes y tienen el potencial de transferir material genético entre diferentes bacterias. En estudios se demostró que pueden encapsular plásmidos enteros (de tamaños de aproximadamente 30 kb) y a menor frecuencia, fragmentos de ADN cromosómicos, demostrando así un enorme potencial para la adquisición y diseminación de genes de resistencia a los antimicrobianos (RAM).^{10, 11}

4) Por último, la conjugación, el mecanismo más importante en la diseminación de genes de RAM, en la cual el ADN se transfiere como un plásmido, a través del contacto célula-célula.¹²

De estos cuatro mecanismos que incluye la transferencia horizontal de genes (EGMs), solo los dos últimos involucran elementos genéticos móviles. Actualmente se conocen unos pocos ejemplos de diseminación de genes de RAM mediada por transformación, OMVs o transducción, mientras que la transferencia de estos genes mediada por plásmidos (conjugación) constituye el modo más eficiente para la diseminación de RAM.¹¹ Los plásmidos se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, y tienen tamaños que suelen variar desde una kilobase hasta varias megabases.^{13, 14} Los plásmidos son elementos de ADN autoreplicantes y heredables, en su gran mayoría circulares, y pueden incluir un sistema de conjugación, en cuyo caso se los denomina “plásmidos conjugativos”.¹⁵ Fueron los mayores responsables de diseminar los genes de RAM entre diferentes especies bacterianas desde el principio de la era de los antibióticos.¹⁶ Está descrito que pueden dar lugar a la transmisión de genes de RAM entre aislamientos de pacientes dentro de un hospital, producir epidemias y tener un rol fundamental en la diseminación mundial.^{17, 18}

El proceso de conjugación consiste en el pasaje de un plásmido de una célula dadora a otra aceptora e involucra el pasaje de una sola cadena de ADN, que luego se replica para generar ADN doble cadena en la célula aceptora. Para que este mecanismo pueda llevarse a cabo se necesitan 3 componentes principales: el relaxosoma, que incluye el origen de transferencia (*oriT*), una región del plásmido de aproximadamente 300 pb, donde comienza y termina el proceso de conjugación; la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP), y un sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Figura 2).¹⁹

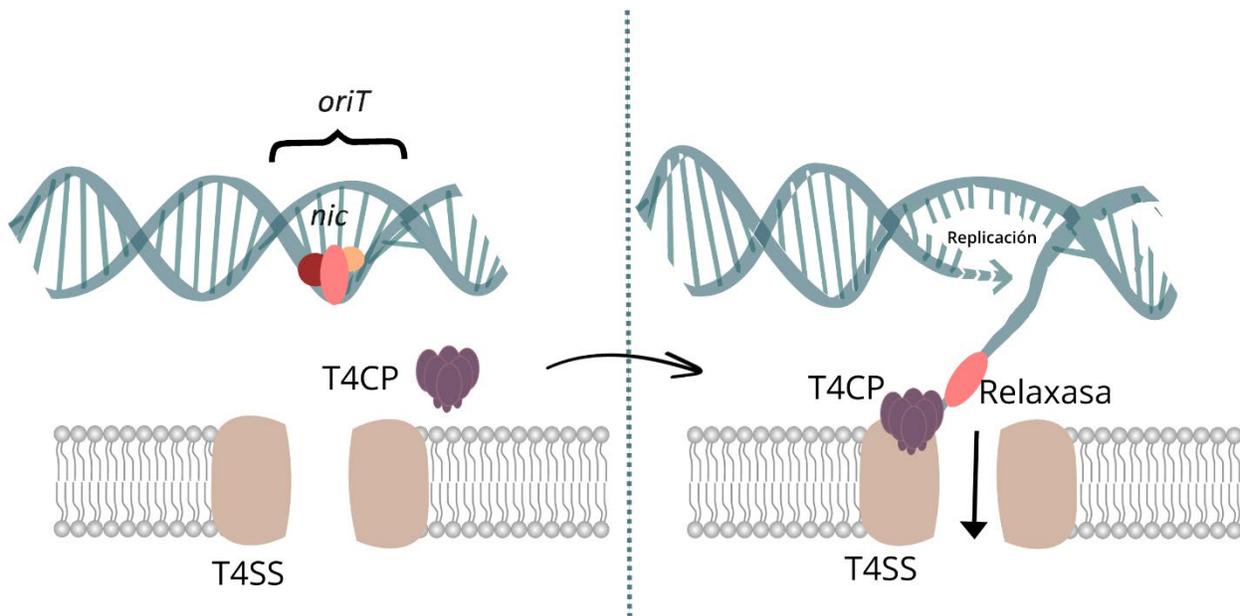


Figura 2. Mecanismo de conjugación biparental. La proteína Mob (óvalo rosa), también denominada relaxasa, está codificada en el plásmido y es esencial para la conjugación. Junto con otras proteínas (círculos marrón y naranja), Mob se une al *oriT*, formando un complejo ADN-proteína denominado relaxosoma. Este complejo permite la relajación del superenrollamiento del ADN plasmídico; Mob corta una de las cadenas en el sitio *nic*, localizado dentro del *oriT*, y permanece unida al extremo 5' de la cadena cortada. Cuando ocurre la replicación del plásmido, T4CP recluta al ADN simple cadena a través de Mob, se acopla a T4SS, e impulsa la cadena de ADN simple cadena a través del mismo, permitiendo la transferencia a la célula aceptora. A medida que el ADN simple cadena ingresa en esta célula, se sintetiza la cadena complementaria, lo cual resulta en la célula aceptora con una copia completa del plásmido, es decir, una transconjugante.¹⁹

El relaxosoma se considera el selector del sistema de conjugación, confiriendo especificidad a cada plásmido, ya que la relaxasa solo actúa sobre el *oriT* del mismo sistema, pero no sobre otros de plásmidos relacionados. Por esta característica, algunos plásmidos que solo poseen un *oriT* y el gen *mob*, se denominan “movilizables”, ya que pueden conjugarse utilizando la maquinaria de transferencia de otro plásmido que sea conjugativo y esté presente en la misma célula.²⁰

T4CP es una proteína multimérica que tiene funciones muy especiales: es un motor molecular y, además, conecta un complejo núcleo proteico (relaxosoma), con un sistema de secreción de proteínas (T4SS), permitiendo la exportación de ADN a través de este último.¹⁹

T4SS es un complejo multiproteico, que incluye como mínimo 10 proteínas, y en la mayoría de los casos está codificado en una región de 30 kb o más. Este complejo incluye un poro y un conducto de secreción, que atraviesa las membranas interna y externa de la célula dadora, y además, un apéndice filamentoso denominado *pilus*, que permite que se produzca el contacto directo entre las superficies de la célula dadora y la aceptora.¹⁹

(b) Clasificación de plásmidos mediante grupos de incompatibilidad

Los plásmidos pueden funcionar como vectores que permiten la diseminación de la RAM, incluyendo genes de resistencia a β -lactámicos, aminoglicósidos, colistina, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprima, macrólidos y quinolonas. Existen plásmidos que, dentro de la misma molécula, contienen genes que codifican para mecanismos de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Es por esta razón que identificar las características de los plásmidos y el fenotipo de resistencia que confieren en las diferentes bacterias hospedadoras provee un conocimiento fundamental en el estudio de la multiresistencia a los antibióticos. Los plásmidos con genes de RAM suelen tener un tamaño mayor a 50 kb, son conjugativos y además tienen un control muy estricto del número de copias.²¹

La portación de plásmidos otorga ventajas evolutivas a sus huéspedes bajo ciertas condiciones de presión de selección, pero también implica un costo fisiológico muy alto para la célula, y tiempo para replicar el ADN extra. Es por esto que la relación que se genera entre el plásmido y el hospedador puede pasar de parasitismo a mutualismo, dependiendo del contexto ecológico. Algunos plásmidos también contienen sistemas toxina/antitoxina que impiden que las células hijas no reciban una copia del plásmido, asegurando su estabilidad.²²

Los plásmidos contienen replicones (mínimo fragmento de ADN que asegura la replicación), el cual consiste en un origen de replicación (*oriB*), y proteínas iniciadoras de la replicación (Rep) que se unen al *oriB* y a sus factores de regulación.²³ Existe un fenómeno denominado “incompatibilidad de plásmidos”, el cual consiste en la incapacidad de que dos plásmidos con el mismo replicón coexistan en forma estable en la misma célula. Este fenómeno se ha utilizado para clasificar a los plásmidos según su grupo de incompatibilidad. Es decir, plásmidos que comparten un mismo replicón, pertenecen a un mismo grupo de incompatibilidad.²¹

Actualmente, los ensayos biológicos que se utilizaban para determinar el grupo de incompatibilidad mediante el análisis de la coexistencia de dos plásmidos en la misma célula sin presión de selección, dejaron de realizarse y se reemplazaron por un sistema de tipificación molecular denominado Inc/rep. Este sistema, propuesto por Carattoli y col.,²⁴ consiste en una serie de ensayos de PCR diseñados para amplificar fragmentos de genes *rep* de diferentes grupos de incompatibilidad. Más recientemente, este sistema se actualizó para utilizarlo con secuencias obtenidas por NGS, mediante una herramienta *online* denominada *PlasmidFinder*, específica para Enterobacterales. Esta herramienta permite identificar si entre las secuencias obtenidas por NGS que se desean estudiar, existe alguna secuencia que tenga alta identidad con las de los amplicones incluidos en el sistema de identificación de Carattoli, o de algunas variantes adicionales de la base de datos de *PlasmidFinder*.²¹ Cabe recalcar que este sistema se basa en identificación de secuencias y no en experimentos biológicos que demuestren compatibilidad/incompatibilidad de replicones. Por esta razón actualmente se utiliza el término

“replicón” en vez de “grupo de incompatibilidad”.²⁵ Con la disminución del costo de la NGS, y el consecuente incremento en la cantidad de secuencias de plásmidos disponibles en las bases de datos, se volvió más sencillo analizar la relación genética entre diferentes plásmidos mediante herramientas bioinformáticas. Es por esto que cuando se desea clasificar el replicón de un plásmido en estudio, ya no se considera necesario realizar los ensayos biológicos de confirmación de compatibilidad.²⁵

La ventaja de clasificar los replicones de los plásmidos en estudio, es que se pueden “rastrear” y trazar un recorrido epidemiológico de los plásmidos asociados al mismo grupo Inc, e incluso, identificar si se describió como un plásmido epidémico y su asociación a diferentes genes de RAM.²⁴ La base de datos de plásmidos bacterianos denominada PLSDDB, obtenida a partir de la información del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), constituye una excelente herramienta para esos análisis, ya que permite filtrar las secuencias por las características del plásmido (tamaño, taxonomía y topología).²⁶

Dado que la información sobre las características de los diversos grupos de replicones es muy extensa, se describirán brevemente los rasgos más importantes de los grupos de incompatibilidad que son pertinentes para entender los resultados obtenidos en esta tesis.

Hasta la fecha existen diversos grupos de incompatibilidad de plásmidos: A, B, C, D, E, F, FI, FII, FIII, FIV, H, I, Ia, I2, Ic, Id, If, J, K, M, N, P, T, V, W y X. Los grupos de incompatibilidad F, I, A, C, L, N y H son los que portan mayor variedad de genes de RAM.²⁵

(i) Plásmidos del complejo A/C

Los plásmidos del grupo de incompatibilidad A y C fueron los primeros asociados a genes de RAM en bacterias gran negativas.²⁷ Inicialmente se identificó al grupo C, pero luego se combinó con el grupo A, ambos compatibles y relacionados. Hace pocos años, se sugirió dividirlos en dos: A/C₁ y A/C₂, según diferencias encontradas entre ellos que representaban cientos de años de evolución independiente entre los dos grupos. Actualmente, el grupo A/C₂ se considera C, y se dividió en grupos tipo 1 y 2, siendo el primero de muy baja prevalencia, mientras que el grupo A/C₁ se consideró como grupo A. Se encontraron plásmidos C₂ en diferentes aislamientos bacterianos, recuperados de humanos, bovinos, porcinos, peces y aves de corral.²⁷ Si bien en se propuso denominar conjuntamente a todos estos grupos como “complejo A/C” en esta tesis, se considerarán como grupos separados, ya que concuerda con la última modificación de la base de datos de PlasmidFinder (1 de octubre de 2019) para este grupo de plásmidos.¹⁴

Estos plásmidos son grandes, con un esqueleto básico de aproximadamente 128 kb, que contiene más de 120 marcos de lectura abiertos (ORFs, por *Open Reading Frames*). Estos ORFs corresponden a genes requeridos para la replicación, conjugación, transferencia (*tra*), metabolismo del ADN, partición, sistema toxina/antitoxina, y algunos ORFs de función desconocida. Los plásmidos de los grupos C contienen río arriba del gen *repA*, un gen *mob* que es

esencial para conjugación. Los genes *tra* se identificaron por homología con otro sistema de conjugación, pero no se estudiaron en profundidad. Los plásmidos C₂ suelen contener una isla de genes de RAM en un sitio específico, portando algunos de los primeros genes de RAM descritos (*sul2*, *strAB*, *tet*, y/o *flaR*), flanqueados por secuencias de inserción (ISs) muy asociadas a la diseminación de genes RAM, como IS26 e ISCR2. La diseminación de esta isla es de tal magnitud que algunos autores la consideran parte del esqueleto básico del plásmido.^{14, 25} La cantidad de plásmidos A y C que existen en la PLSDB hasta la fecha se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de plásmidos por grupo incluidos en PLSDB (diciembre 2022).

Grupo de plásmidos	Cantidad en PLSDB
A1	26
U	38
M	126
L	199
R	444
N	515
C1	518
I	935
HI2/HI2A	958
X	960
F	5610*

*La mayoría con más de un replicón F.

(ii) Plásmidos F

El primer vector que se describió con la capacidad de transferirse horizontalmente, consistió en un plásmido de 100 kb encontrado en *Escherichia coli*, que se utilizó como modelo para estudiar la conjugación. Se lo llamó “plásmido F” o “Factor F”, en alusión a la palabra fertilidad, y los plásmidos relacionados a este se incluyen en un grupo denominado “F”. Estos plásmidos también fueron de los primeros que se describieron asociados a genes de RAM en Enterobacterales.^{14, 28} En general, tienen un esqueleto básico de 60 kb, con los genes de transferencia en la parte más conservada. Los genes involucrados en la formación del *pilus* de los plásmidos F se estudiaron en profundidad.⁴ El esqueleto básico de los plásmidos F contiene un gen altamente conservado *s/t*, que codifica para una transglicosilasa lítica que puede degradar localmente el peptidoglicano, facilitando el ensamblaje del sistema T4SS en la envoltura celular. Río abajo de ese gen, se localizan el *oriT* y los genes del T4SS. La mayoría de estos plásmidos también se caracteriza por tener el gen de inhibición de la conjugación *finO* deletado por una IS. Por esta razón, los plásmidos F tiene una alta tasa de conjugación.^{14, 28}

Los plásmidos F contienen un sistema toxina/antitoxina de mantención adicional, cuya toxina se activa en el momento de la división celular eliminando a la bacteria que no posee el plásmido.

Existe mucha variabilidad entre los genes del esqueleto básico de los plásmidos del grupo F, los cuales se intercambian entre sí, generando mosaicos y diferentes combinaciones, que hacen que la clasificación del grupo sea compleja.²⁸ Se describieron varios replicones, que originariamente se definían por los subgrupos de FI a FVII.

La replicación de los plásmidos F se lleva a cabo por varios módulos de replicación, de los cuales RepFIA es el principal. Este módulo permite que los plásmidos del grupo F se mantengan en solo una copia por célula. El iniciador de la replicación FIA RepE es necesario para separar las hebras de ADN y reclutar a las proteínas del huésped. Esta secuencia se encuentra flanqueada por iterones, que son regiones directas repetidas de 19 pb, ricas en A-T, y cajas de DnaA (oriS). RepE se une como dímero a sitios de un operador que reprime la transcripción y previene el inicio de la replicación. Para que se inicie la transcripción se requiere que se monomericen por una chaperona. Cuando el número de copias es bajo, el monómero RepE se une a los iterones e inicia la transcripción. Los plásmidos F también pueden contener otro módulo de replicación, RepFIB, que contiene el gen *repB*, cuyo producto proteico puede mantener la replicación en ausencia del primer módulo RepFIA. El tercer módulo de replicación que se puede encontrar en los plásmidos F es el RepFII (previamente denominado RepFIC), pero este módulo no es funcional, ya que tiene interrumpido el gen *repA* por un *Tn1000*. Existen algunos plásmidos similares a los del grupo F, en los cuales se observó un módulo RepFII funcional.²⁸

Es bastante común encontrar plásmidos F con múltiples replicones, por ejemplo, con las combinaciones FIIA - FIC y FIA - FIB.¹⁴ Esta situación también se ve reflejada en la base de datos PLSDb, en la cual el grupo F es el más abundante, con 5610 secuencias incluidas a diciembre 2022), la mayoría de ellas con más de una replicón F (Tabla 1).

(iii) Plásmidos HI

Los plásmidos HI generalmente son mayores a 200 kb, por esta razón se incluyen dentro de los plásmidos de mayor tamaño. Estos plásmidos suelen llevar genes de resistencia a las quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, carbapenemes, cloranfenicoles y fosfomicina, además de resistencia a los metales pesados como mercurio, cobre, iones de plata, telurito, arseniato y arsenito.¹⁴

Estos plásmidos se caracterizan por tener múltiples replicones, varios son específicos del grupo HI, pero otros son muy similares a algunos observados en el grupo F.²⁹ Inicialmente, mediante hibridación de ADN, análisis de restricción y ensayos de incompatibilidad, los plásmidos HI se habían clasificado en tres subgrupos, denominados HI1, HI2 y HI3. Los subgrupos HI1 y HI2, tenían en común el replicón *repHI1A*, responsable de la incompatibilidad entre ambos subgrupos. En cambio, *repHI1B* se encontró sólo en plásmidos HI1, que también tenían un replicón similar a *repFIA*, responsable de la incompatibilidad entre HI1 y el grupo F. El replicón *repHI2* es exclusivo de los plásmidos HI2. Sin embargo, luego de esta clasificación inicial, se describieron otros plásmidos HI, con variantes de los replicones previamente reportados, como pNDM-MAR, que

contenía replicones similares a *repHI1B* y *repFIB*, y pNDM-CIT, con un replicón similar a *repHI1A* y una nueva variante de *repHI1B*, distinta de la encontrada en pNDM-MAR. Cabe destacar la importancia de este último plásmido, de 267 kb, ya que contenía *bla_{NDM-1}*, *bla_{CTXM-15}* y *qnrB1*, junto con otros genes de RAM.³⁰ Dado a que, en ese momento la clasificación de los plásmidos HI se había tornado muy confusa, se realizaron análisis filogenéticos de sus genes *core* concatenados (principalmente *rep* y las regiones *trh*), incluyendo nuevos plásmidos descubiertos recientemente, lo cual resultó en una nueva clasificación en 5 subgrupos: HI1 a HI5 (Tabla 2). En esta tesis, se usará esta nueva propuesta.²⁹

Los plásmidos HI1 y HI2 tienen un esqueleto básico muy similar, observándose gran identidad entre proteínas esenciales equivalentes. En ambos subgrupos, los genes implicados en la conjugación se encuentran en dos regiones separadas: Tra1 (o Trh1), que contiene el *oriT* y los genes que codifican para los componentes proteicos del relaxosoma y algunos componentes del T4SS, y Tra2 (o Thr2), que contiene los genes que codifican para el resto de los componentes del T4SS.¹⁴ Una característica particular radica en que la síntesis óptima del *pilus* ocurre entre los 22 y los 30°C, y aunque el *pilus* permanece estable a los 37°C, a esta temperatura se inhibe la formación del agregado de proteínas necesario para la conjugación. La optimización de este sistema de conjugación a temperaturas de 22 a 30°C podría ser muy útil para la diseminación de los plásmidos HI1 y HI2 en el ambiente.^{14, 31} En PLSDDB, existen 958 plásmidos identificados dentro de los subgrupos HI (Tabla 1).

Tabla 2. Subgrupos de plásmidos HI definidos según la combinación de replicasas. Se muestran las dos clasificaciones principales de subgrupos HI.

<i>Distribución de los genes de replicasas según los grupos de plásmidos HI</i>			
<i>Subtipo de HI</i>	Genes de replicasas, según la clasificación previa	Genes de replicasa, según la nueva clasificación	Plásmidos representativos
HI1	<i>repHI1A+repHI1B+repFIA-like</i>	<i>repHI1A+repHI1B+repFIA-like</i>	R27 pEQ1 pHCM1 pO111_1
HI2	<i>repHI1A+repHI2</i>	<i>repHI2A+repHI2C</i>	R478 pAPEC-O1-R pKST313 pP10164-2 pT5282-mphA p112298-catA
HI3	<i>repHI1B-like+repFIB-like</i>	<i>repHI3B+repFIB-like</i>	pNDM-MAR pPKPN1 pPMK1-NDM pENVA
HI4	<i>repHI1A-like+repHI1B-like*</i>	<i>repHI4A+repHI4B</i>	pNDM-CIT pF8025 pPSP-75c pPSP-a3e
HI5	<i>repHI1B-like**+repFIB-like</i>	<i>repHI5B+repFIB-like</i>	pKOX-R1 pKpNDM1 pYNKP001-dfrA

* Variante distinta a las observada en los subgrupos HI3 y HI5. ** Variante distinta a las observada en los subgrupos HI3 y HI4.

(iv) Plásmidos del complejo I

En el complejo de plásmidos I, se incluyen los tipos I1 (I α), I γ , B/O, K, y Z¹⁶ ya que sus *pili* tienen morfologías, y producen serologías, muy similares entre sí.¹⁴

Una particularidad que existe en los plásmidos de este complejo, es que generan dos *pili*: uno grueso, codificado por los genes *tra*, y otro fino, codificado por los genes *pil*, que aparentemente estabilizan el sistema de conjugación en medios líquidos, pero no en superficies sólidas. Además, los plásmidos I1, I γ y algunos otros de este complejo, contienen una región *shufflon*, compuesta por el gen *rci*, que codifica para una recombinasa, y una zona adyacente que contiene secuencias repetidas de 19 pb denominadas *sfx*, las cuales separan segmentos que contienen ORFs parciales. Esta región con *sfx* se superpone con *pilV*, que codifica para una adhesina localizada en la punta del *pilus* delgado. Mediante recombinaciones entre las secuencias *sfx*, mediadas por la recombinasa Rci, se producen rearrreglos y deleciones en *pilV*, causando diferentes variantes en el extremo C-terminal de la proteína PilV. Estas variantes resultan en diferentes eficiencias de conjugación y/o de producción de biofilm y adherencia.¹⁴

(v) Plásmidos L y M

Los plásmidos de los grupos L y M se habían agrupado como L/M, hasta que Carattoli y col. propusieron su separación.³² Tienen amplio rango de hospedador, siendo la mayoría Enterobacterales. Contienen genes de RAM y tienen una región de replicación conservada con tres genes: *repA* (codifica para la proteína de iniciación), *repB* y *repC* que tienen funciones reguladoras. Los genes de conjugación se encuentran en una gran región extensa, denominada *tra*, y una menor, denominada *trb*. Actualmente, los grupos L y M se consideran como tres grupos: L, M1, y M2, por sus diferencias en la relaxasa (*traX*), y en los genes *traY* y *exxA*.³³ Actualmente la base de datos del PlasmidFinder contiene 3 referencias que permiten discriminar correctamente los plásmidos de estos tres grupos.¹⁴

En PLSDB existen a la fecha 199 secuencias catalogadas dentro del grupo L, 65 en el M1 y 61 del M2 (Tabla 1).

En PLSDB existen a la fecha 935 secuencias catalogadas dentro del grupo I (Tabla 1).

(vi) Plásmidos N

Los plásmidos N son conjugativos y relativamente pequeños y uno de los más frecuentemente encontrados en Enterobacterales de muestras de origen animal y humano. Tienen amplio rango de hospedador, asociados con diferentes genes de RAM, en especial con *bla*_{CTX-M-1}.^{14, 34} Se observó que suelen estar presentes en la microbiota de los animales de consumo, por lo que podrían ser un reservorio y potencial diseminador de genes de RAM a través de la cadena alimentaria.³⁴

La región de conjugación de los plásmidos N se compone de dos partes, una codifica para funciones de exclusión del ingreso del plásmido a la célula y para los componentes del *pilus*, y la otra contiene el *oriT* y algunos genes *tra*. Ambas regiones están separadas por un gen *fipA*, que codifica para una proteína que inhibe la conjugación de un plásmido P1 corresidente, por lo cual es poco frecuente la coexistencia de plásmidos de estos dos grupos. Los esqueletos básicos de los plásmidos N están bien conservados, y suelen tener integrones de clase 1 complejos río arriba del gen de la resolvasa, *resP*, y otras inserciones dentro o cerca del *fipA*.¹⁴ Estos plásmidos se dividen en 3 subgrupos: N1 al N3. El replicón de los plásmidos del subgrupo N1 es diferente al de los plásmidos del subgrupo N2, mientras que la replicasa de los plásmidos N2 es 80% idéntica a la de los plásmidos N3.¹⁴

En PLSDB existen 515 entradas de plásmidos clasificados como N hasta la fecha (Tabla 1).

(vii) Plásmidos R

El primer plásmido R descrito fue pK245, portador de *qnrS1*. Para la identificación de este grupo, se utiliza como blanco el gen de la replicasa, *repB*. Sin embargo, los plásmidos que sólo contienen *repB* no son conjugativos, debido a la pérdida de los genes *tra*, y la ausencia de relaxasas. Esto podría explicar la razón por la cual los plásmidos del grupo R con *repB*, suelen tener replicones adicionales, como FII(K), A, C u otros genes *rep* no identificados. De hecho, el plásmido pK245 también contiene un replicón adicional, similar a FII. Por esta razón, algunos autores consideran que el grupo R no debería considerarse como un grupo *per se*.¹⁴

En PLSDB existen hasta la fecha 444 secuencias asignados a este grupo, pero la mayoría también contiene replicones de otros grupos, siendo el F el más abundante (Tabla 1).

Finalmente, es importante recalcar que existen plásmidos que contienen más de un replicón, como ya se describió para los grupos F, HI y R. Más aún, en el grupo F, además de diferentes variantes de un replicón perteneciente a este grupo, se encontraron plásmidos en forma de cointegrados, con un replicón F coexistiendo con otro I1, o N.²⁵

(viii) Plásmidos U

Los grupos definidos inicialmente como IncG/IncP-6, se juntaron posteriormente con el grupo U, ya que se demostró incompatibilidad con este último. Los plásmidos del grupo U tienen un amplio rango de hospedador, incluyendo α -, β - y γ -proteobacterias, y bajo número de copias, con un rango de tamaño de 29 a 60 kb. Suelen estar asociados a aislamientos provenientes del ambiente, y el primero de este grupo se aisló de *Aeromonas salmonicida*. Se encontraron plásmidos del grupo U con genes de resistencia a trimetoprima, cloranfenicol, ampicilina, tetraciclinas, sulfonamidas, kanamicina y estreptomycin.^{14, 25}

En PLSDB existen hasta la fecha sólo 38 secuencias provenientes de plásmidos asignados a este grupo (Tabla 1).

(ix) Plásmidos X

Los plásmidos X son generalmente de pequeño tamaño (30-50 kb), y se dividen en seis subgrupos: X1 a X6. Son de rango de hospedador acotado y principalmente se encontraron en *E. coli* y *Salmonella*. Precisamente, la adquisición de los plásmidos X en *Salmonella Enteritidis* se dio mediante fagos y, probablemente, antes del amplio uso clínico de los antibióticos en la práctica clínica.¹⁴ En PLSDDB existen a la fecha 960 identificadas como grupo X (Tabla 1).

Sección 1.04 Otros elementos genéticos móviles

Además de los plásmidos y los bacteriófagos, existe una gran variedad de EGMs: secuencias de inserción (ISs), transposones, sistema integrón/casetes, elementos integrativos y conjugativos (ICEs, por *Integrative and conjugative elements*), islas genómicas, y elementos transponibles con repeticiones invertidas, en miniatura (MITEs, por *Miniature inverted repeat transposable elements*). Se detallan a continuación, aquellos que tienen más relevancia en la diseminación de genes de resistencia, y en Enterobacterales.¹⁴

(a) Secuencias de inserción: generalidades y clasificación

Las ISs son segmentos de ADN que suelen tener de 0,7 a 2,5 kb. Contienen uno o dos ORFs, que codifican para la enzima responsable de su transposición (Figura 3). Esta enzima denominada transposasa (TnpA), es una recombinasa que cataliza el clivaje de ADN y la transferencia de las hebras, permitiendo el movimiento de la IS a otro sitio del genoma. Algunas veces, además de la transposasa, la IS puede contener proteínas reguladoras. En los dos extremos de la IS, se encuentran secuencias de 10 a 40 pb, repetidas e invertidas (IRs, por *inverted repeats*). Por convención, la IR localizada río arriba de *tnpA* se escribe a la izquierda, y se denomina IRL (por IR *left*), y consecuentemente, la IR localizada río abajo de este gen se escribe a la derecha, y se denomina IRR (por IR *right*). En la mayoría de los casos, la transposición genera una duplicación del sitio de inserción (TSD, por *Target site duplication*), lo cual resulta en la aparición de secuencias de unas pocas pb, directas y repetidas, que flanquean a la IS. Todas estas características corresponden a la gran mayoría de las ISs descritas, pero a lo largo del tiempo se fueron describiendo otras ISs con características que ya no se ajustan específicamente a las mencionadas aquí, y que hacen que la diferencia entre las ISs y otros EGMs sea cada vez más difícil de establecer. Por ejemplo, hay ISs con longitudes mucho mayores a 2,5 kb, o que contienen varios genes no relacionados a la transposición.^{14, 35} Existe una base de datos para ISs, denominada *ISFinder*, que permite analizar secuencias de ADN para determinar la presencia de ISs que ya fueron caracterizadas, además de centralizar la información disponible de estas últimas. Si bien esta base es extensa, se estima que sólo representa una fracción de las ISs presentes en las bases de datos públicas.³⁵

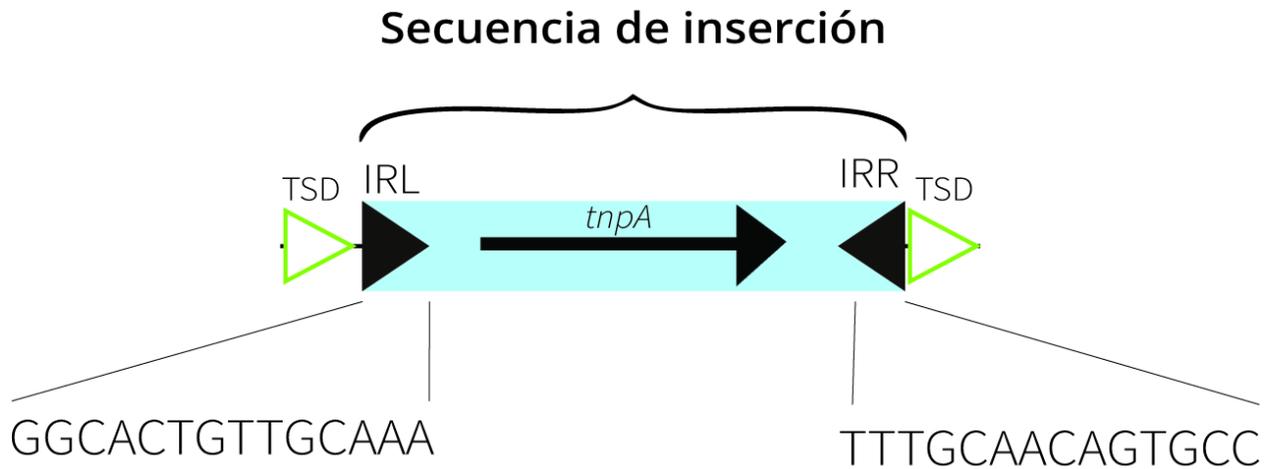


Figura 3. Componentes de una secuencia de Inserción. Se utiliza como ejemplo IS26 con sus respectivos IRR e IRL; en este caso, el TSD es de ocho pb.

Las ISs se pueden clasificar mediante dos características. La clasificación principal se basa en la química de las reacciones que cataliza la TnpA para cortar y religar las cadenas de ADN durante la transposición, estableciendo dos categorías que se designan por los amino ácidos conservados en el sitio activo de la TnpA: DDE o DEDD, y HUH (dos residuos de histidina separados por un aminoácido hidrofóbico grande).³⁵

La segunda clasificación se basa en el mecanismo de transposición que realiza la transposasa, y también establece dos categorías (Figura 4). En el mecanismo de **transposición conservativo**, la IS se escinde de la molécula dadora y se inserta en la molécula aceptora, con lo cual el número de copias de la IS es el mismo antes y después de la transposición. En cambio, en la **transposición replicativa**, la IS se replica uniendo las moléculas dadoras yceptoras, formando un cointegrado, que luego se resuelve resultando en una copia de IS en cada molécula (queda una copia adicional de la IS luego de la transposición).¹⁴

Existen ejemplos, principalmente en bacterias Gram negativas, en las que una IS es capaz de capturar y movilizar regiones adyacentes a su sitio de inserción, que puede incluir uno, o más, genes de RAM. Además, algunas ISs incluyen un promotor fuerte que permiten la expresión del gen capturado.¹⁴ Un ejemplo paradigmático de estos casos es *ISEcp1*, que capturó el gen de resistencia a quinolonas *qnrE1*, presente en el cromosoma de *Enterobacter cloacae*, y lo insertó en un plásmido de *Klebsiella pneumoniae*, otorgándole también una secuencia promotora que permite su expresión en la nueva localización plasmídica.³⁶

El grupo de trabajo que desarrolló ISFinder clasificó a las ISs en 29 familias, con varias de estas divididas en subgrupos, teniendo en cuenta diversas características, como la química de la transposición, la longitud y secuencia de los IRs, o del TSD, la organización de los ORFs incluidos en la IS, y la naturaleza de sus sitios blanco, entre otras.³⁵

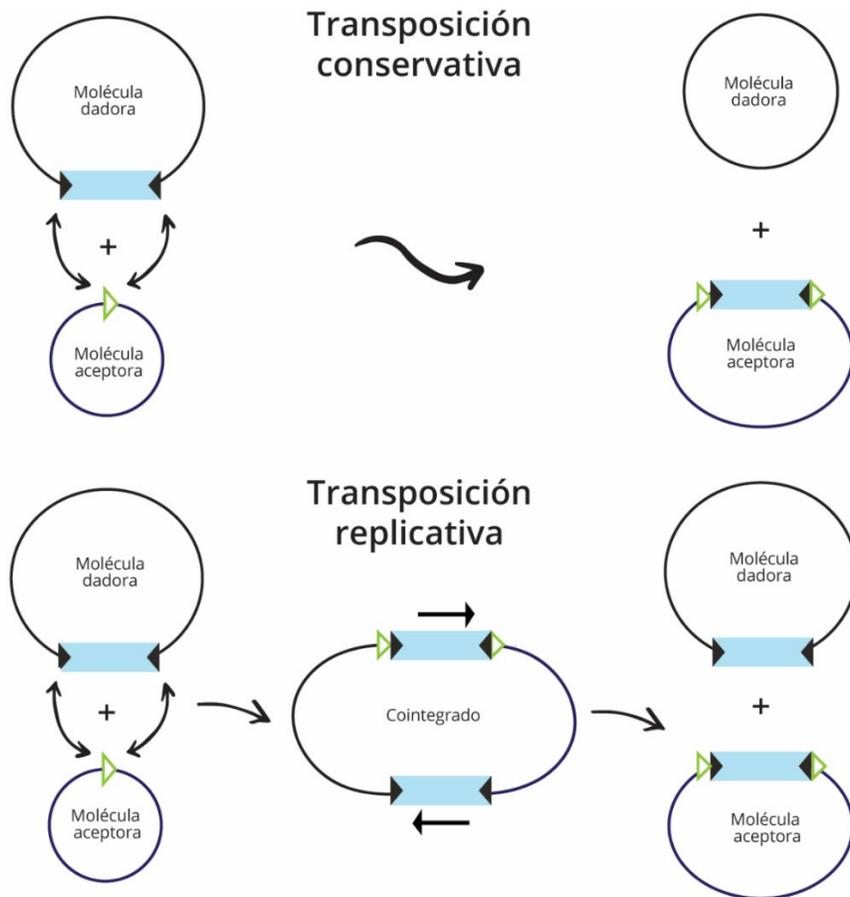


Figura 4. Mecanismos de transposición conservativa y replicativa. La IS se representa por un rectángulo celeste (los IRs están indicados por triángulos negros). El triángulo verde indica el sitio de inserción y su correspondiente TSD. Las flechas horizontales en el cointegrado indican el sentido de transcripción de *tnpA*.

(b) Secuencias de inserción: la relevante familia IS26

La familia IS26, previamente denominada IS6, es la más asociada a diseminación de la RAM, tanto en bacterias Gram negativas (IS26 y sus isoformas), como en Gram positivas (IS257 e IS1216). Por esta razón, la familia IS26 es el grupo más estudiado.³⁷ Además de su rol en la diseminación de genes de RAM, las ISs de este grupo producen complejos rearrreglos genómicos (deleciones, inserciones e inversiones) de fragmentos o regiones muy extensas del genoma, lo cual tiene gran trascendencia en la evolución de genomas (cromosomas y plásmidos).³⁸

IS26 es la IS más estudiada de esta familia. Consiste en un segmento de 820 pb, el cual contiene sólo el gen *tnp26* de 705 pb, que codifica para una transposasa del tipo DDE. Además, contiene Irs de 14 pb idénticos, en cada uno de sus extremos, y en la transposición genera un TSD de 8 pb. Al igual que su homólogo IS257, contiene una caja -35 (TTGCAA) localizada a siete pb de los extremos externos de cada uno de sus IRs. Esta propiedad es muy importante, ya que si existe una caja -10 correctamente dispuesta en los fragmentos flanqueantes al sitio de

inserción, se puede formar un promotor híbrido que permita la expresión de un gen localizado adyacentemente al sitio de inserción, como ocurre frecuentemente.³⁹

En el mecanismo de transposición, Tnp26 cliva cadenas de ADN, dejando dos 3'-OH libres: uno en el extremo externo del IRL, y otro en el del IRR. Ambos 3'-OH libres son los grupos reactivos que realizan los ataques nucleofílicos en las cadenas de ADN del sitio de inserción de IS26 en la molécula blanco. Los próximos pasos pueden darse mediante dos mecanismos diferentes de transposición: un mecanismo replicativo, denominado *copy-in*, que depende de Tnp26 y RecA, y un mecanismo conservativo, denominado *targeted transposition*, también dependiente de Tnp26, pero independiente de RecA.⁴⁰ Si la molécula blanco no tiene IS26, solo puede ocurrir el mecanismo *copy-in*, mientras que si hay una, o más, copias de IS26 en la molécula blanco pueden ocurrir ambos mecanismos, pero la frecuencia de *targeted transposition* es 1000 veces mayor que la de *copy-in* (Figura 5).⁴⁰

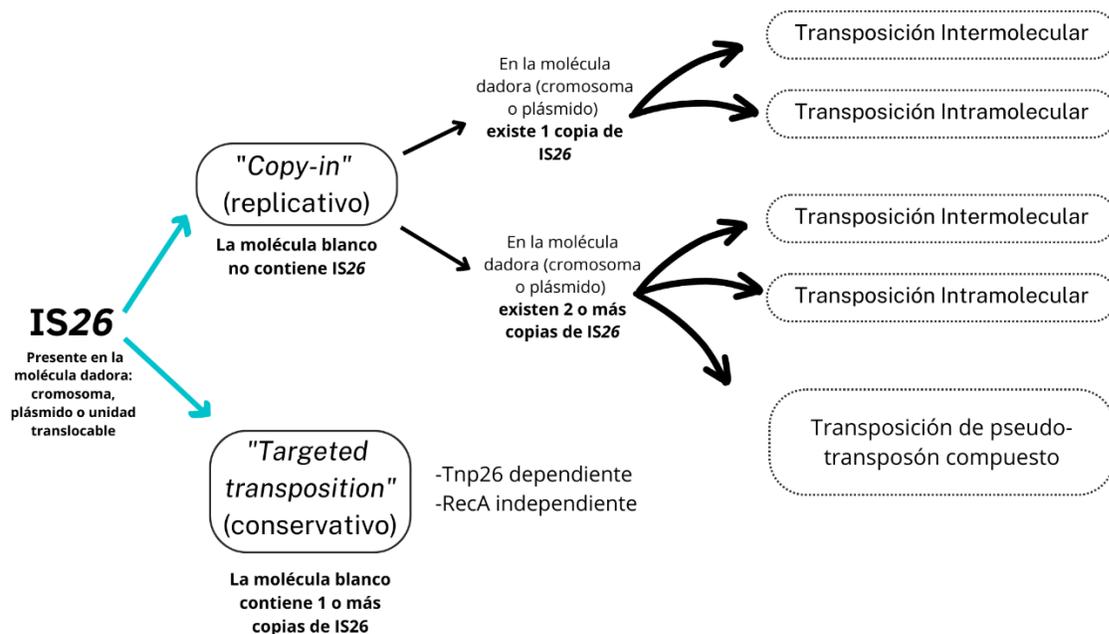


Figura 5. Mecanismos de transposición de IS26.

La **transposición replicativa de IS26** (*copy-in*) puede ocurrir en forma inter o intramolecular. Cuando existe sólo una copia de IS26 en la molécula dadora, el proceso se denomina "cointegración replicativa clásica". En este caso, si la transposición ocurre entre dos moléculas diferentes (transposición intermolecular), el proceso de replicación genera un cointegrado, que contiene las dos moléculas, separadas por dos copias de IS26 localizadas en el mismo sentido, y por TSD (flechas blancas en la Figura 6). Este cointegrado puede resolverse mediante recombinación homóloga, mediada por RecA, dando como resultado la molécula dadora original (plásmido o cromosoma), y la molécula blanco con una copia e IS26 y su TSD

(Figura 6). En cambio, cuando la transposición ocurre de manera intramolecular, es decir dentro de la misma molécula de ADN, ocurre una deleción, o una inversión, de la región de ADN localizada entre la IS26 y su sitio blanco (línea roja discontinua en la Figura 7). Si el ataque nucleofílico de cada extremo 3'-OH libre se produce sobre la misma cadena de ADN, la transposición se denomina "cis", y la molécula sufre deleción. En cambio, si dicho ataque ocurre sobre la cadena opuesta, la transposición se denomina "trans", y genera una inversión.³⁸

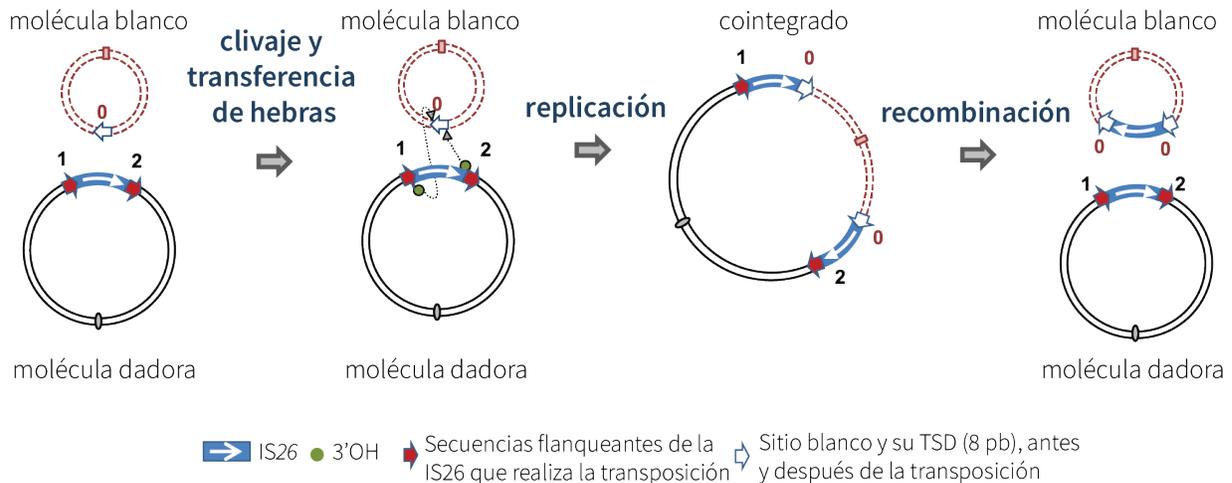


Figura 6. Cointegración replicativa clásica. Las flechas con línea punteada indican los ataques nucleofílicos y las flechas blancas muestran el sitio blanco y su TSD (8 pb), antes y después de la transposición, respectivamente. Esquema adaptado de referencia ³⁹.

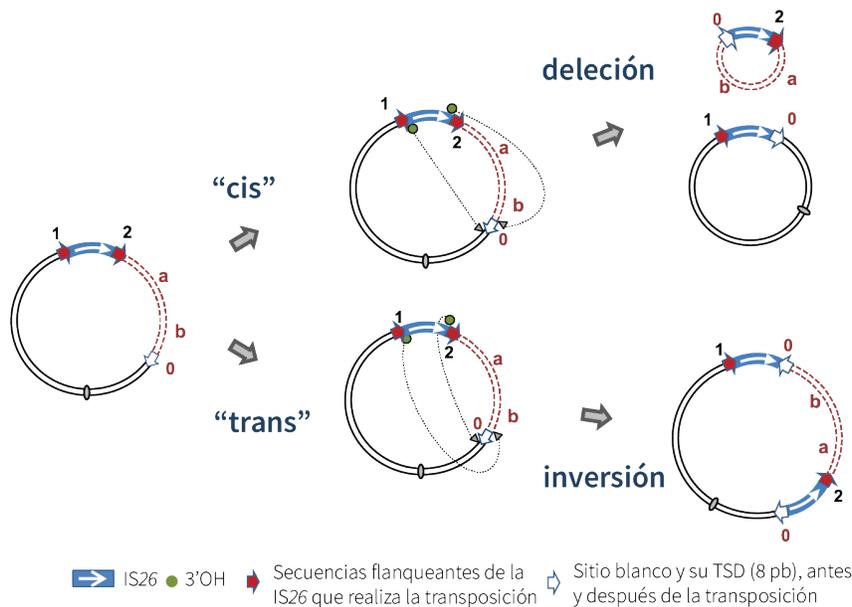


Figura 7. Transposición intramolecular. Las flechas con línea punteada indican los ataques nucleofílicos y las flechas blancas muestran el sitio blanco y su TSD (8 pb), antes y después de la transposición, respectivamente. Esquema adaptado de referencia ³⁹.

Cuando existen dos, o más, copias de IS26 en la molécula dadora, al menos dos de ellas en la misma orientación, también puede ocurrir transposición replicativa, que en este caso se denomina “cointegración replicativa por un pseudo-transposón compuesto”. En este caso, las dos copias de IS26 localizadas en el mismo sentido, flanquean un segmento de ADN (marcado en verde en la Figura 8), que puede contener genes de RAM.³⁸

El ataque nucleofílico se produce de la misma manera que se describió anteriormente: cuando se produce la replicación y se forma el cointegrado, se genera una copia adicional de IS26, lo cual resulta en tres copias localizadas en la misma orientación. El cointegrado se puede resolver por recombinación homóloga entre dos de las tres copias de IS26. Dependiendo de cuáles sean los pares de IS26 que recombinen entre sí, pueden ocurrir dos alternativas. Primero, se regenera la molécula dadora pero con una sola copia de IS26, más la delección del segmento de ADN localizado originalmente entre ambas copias de IS26, y el pseudo-transposón se transfiere a la molécula blanco (Figura 8). La segunda alternativa, es que se regenere la molécula dadora con la estructura idéntica a la original y que se obtenga sólo una copia de IS26 en la molécula blanco.^{38, 40}

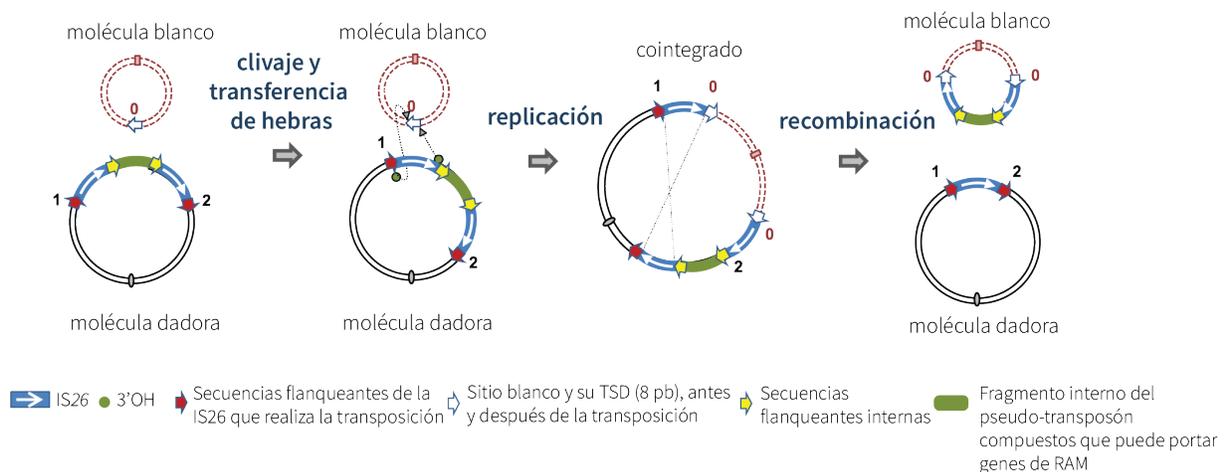


Figura 8. Transposición de un pseudo-transposón compuesto. Las flechas con línea punteada indican los ataques nucleofílicos y las flechas blancas muestran el sitio blanco y su TSD (8 pb), antes y después de la transposición, respectivamente. Para la resolución del cointegrado, solo se muestra una de las dos posibles recombinaciones homólogas entre copias de IS26, que resulta en la transferencia del pseudo-transposón compuesto a la molécula blanco. Esquema adaptado de referencia ³⁹.

Se demostró en diferentes trabajos, que IS26 también puede transponer en forma replicativa, mediante un intermediario circular que se denomina “unidad translocable” (UT). Las UTs se pueden generar de dos maneras, la primera consiste en una recombinación homóloga entre dos copias de IS26, mecanismo independiente de Tnp26 (Figura 9A), y la segunda, en la transposición intramolecular de IS26 en cis (Figura 9B).³⁸

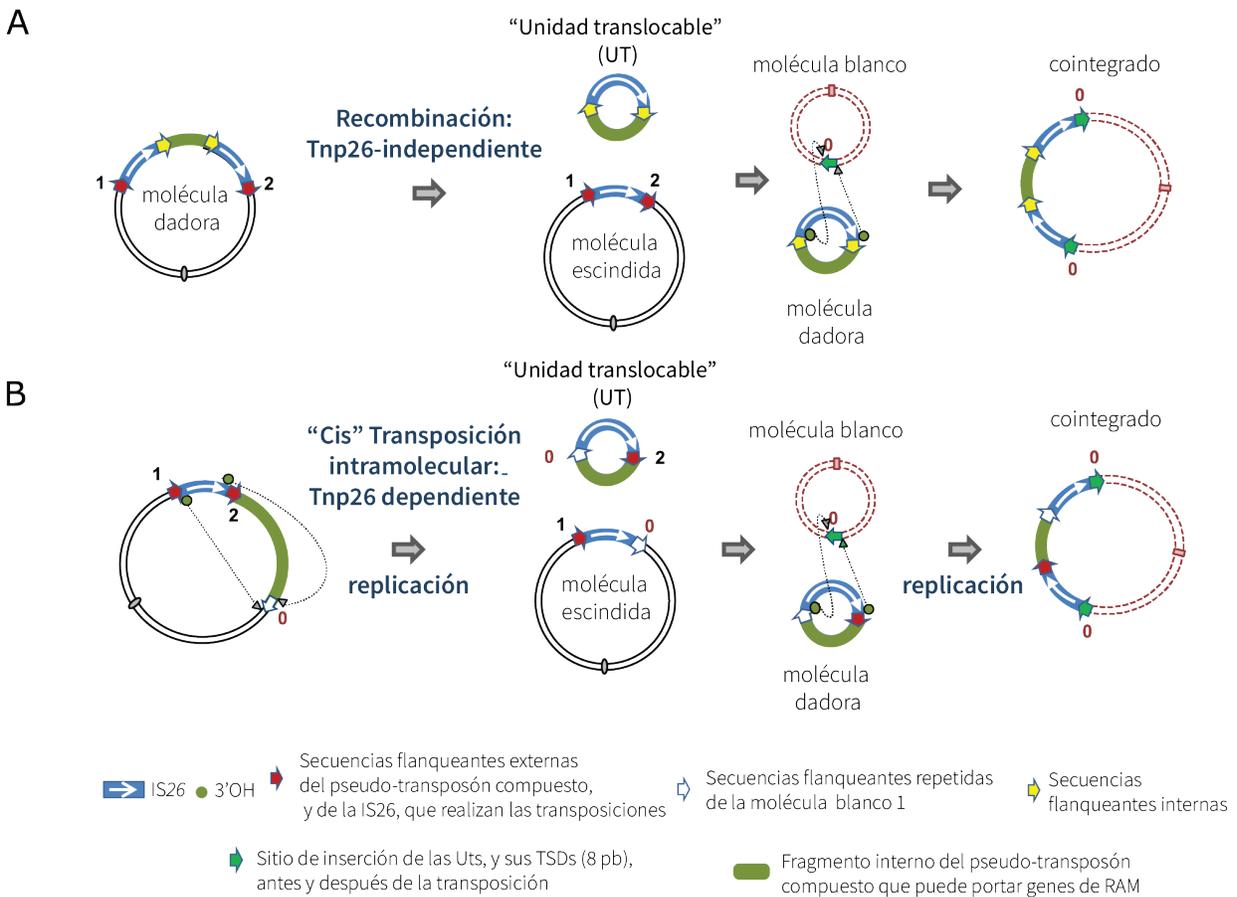


Figura 9. Mecanismos de generación de unidades translocables. Las flechas con línea punteada indican los ataques nucleofílicos. A) Recombinación homóloga (RecA-dependiente) entre dos copias de IS26 localizadas en el mismo sentido. B) Transposición intramolecular de IS26 en cis (RecA-independiente). Las flechas blancas muestran el sitio blanco y su TSD (8 pb), antes y después de la transposición, respectivamente. En ambos casos, la transposición de la UT resulta en un cointegrado, que es un pseudo-transposón compuesto insertado en la molécula blanco, pero con secuencias flanqueantes internas diferentes, dependiendo del mecanismo que genera la UT. Las flechas verdes muestran el sitio de inserción de las Uts, y sus TSDs (8 pb), antes y después de la transposición, respectivamente. Esquema adaptado de referencia ³⁹.

La **transposición conservativa de IS26** (*targeted transposition*) es independiente de RecA, pero dependiente de Tnp26 y para que ocurra, debe existir al menos una copia de IS26 en la molécula blanco. Si bien este mecanismo está bastante estudiado, aún no se dilucidó completamente. Aunque las reacciones de desplazamiento e intercambio de cadenas de ADN son específicas para este tipo de transposición, el resultado final es el mismo que el que se obtendría si ocurriera una recombinación homóloga entre las copias de IS26. Es decir, se genera un cointegrado de las moléculas dadora y blanco, sin que ocurra ninguna duplicación de secuencias (Figura 10). ^{38, 40}

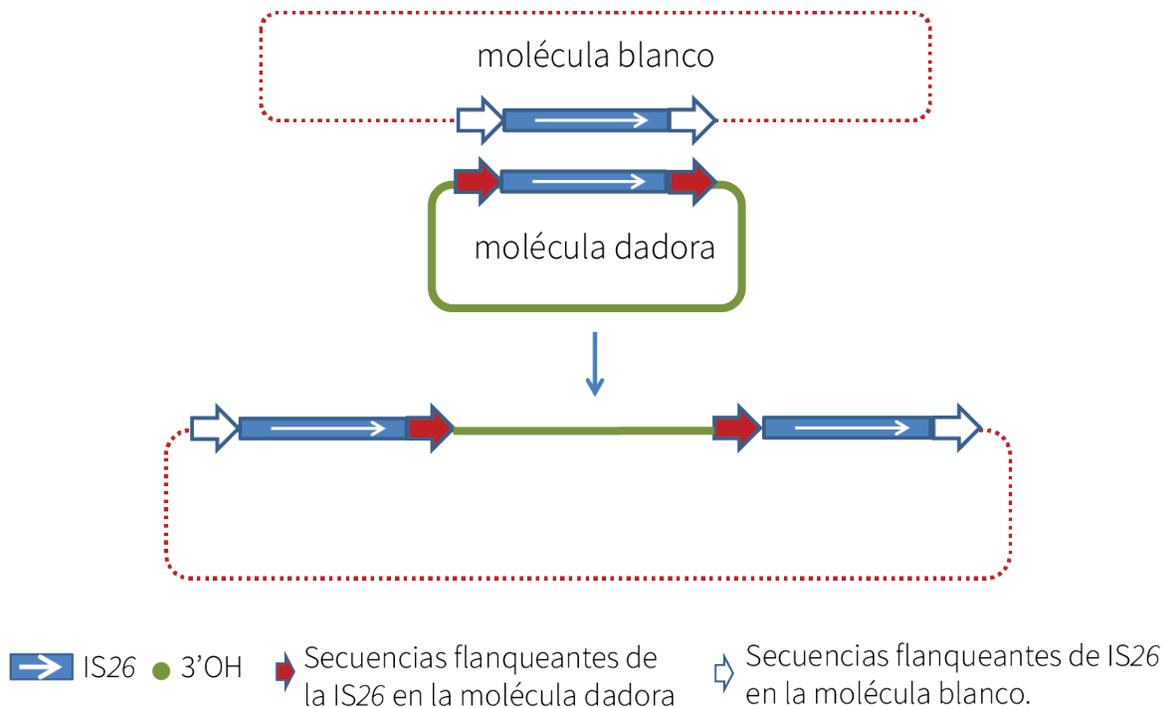


Figura 10. Mecanismo de *targeted transposition* (no replicativo). El esquema, adaptado de referencia ³⁹, solo muestra el resultado final (cointegrado) de todo el proceso de transposición.

Es importante agregar que, cuando la molécula blanco posee una, o más, copias de IS26, se observó que las copias adicionales generadas por transposición replicativa se localizan en las proximidades de aquellas ya existentes. Los mecanismos responsables de este hecho, aún no dilucidados, explicarían la formación de arreglos o *clusters* de genes flanqueados por copias de IS26 que resultan en regiones ricas en genes de RAM cuando se involucra una alta presión de selección. Estos arreglos de genes de RAM flanqueados por IS26 se han denominado *IS26-bounded resistance gene clusters*, y tienen gran relevancia en la epidemiología de la RAM. ^{38, 40}

(c) Transposones

A partir de las ISs, el siguiente nivel de mayor complejidad estructural de los elementos transponibles está conformado por los **transposones compuestos**. Estos elementos están constituidos por dos copias de una misma IS (o dos ISs muy similares), separadas por un segmento de ADN que puede contener diversos genes (Figura 11). Esta estructura puede transponer como una sola unidad, y si el segmento de ADN contiene genes de RAM, participar activamente en su diseminación. Los ejemplos más conocidos de transposones compuestos asociados a RAM son el Tn5 y el Tn10, que contienen genes que confieren resistencia a kanamicina y tetraciclina, respectivamente. Cabe aclarar que los pseudo-transposones compuestos generados por IS26 no se consideran transposones compuestos, ya que su transposición ocurre mediante los mecanismos específicos descritos en el apartado anterior, incluyendo la generación de Uts. Por esta razón, se los denominó como pseudo-transposones compuestos. ¹⁴

Transposón compuesto

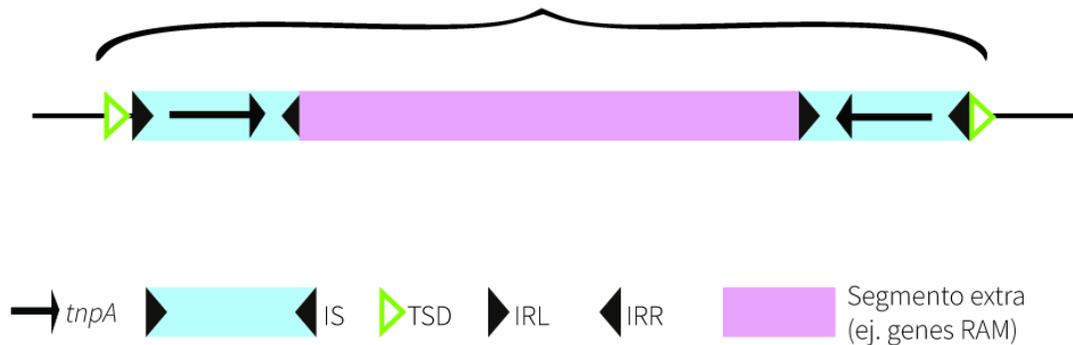


Figura 11. Estructura de un transposón compuesto. Las ISs pueden estar localizadas en el mismo sentido, o en sentidos opuestos.

El nivel de mayor complejidad estructural y funcional de los elementos transponibles corresponde a los **transposones unitarios** (por *Unit transposons*), que incluyen a la **familia Tn3** (con la subfamilia Tn21) y al Tn7, y sus transposones relacionados. De todos estos grupos, la **familia Tn3** es la más relevante para los fines de esta tesis. Esta familia es extensa y muy diversa, en cuanto al tamaño y secuencia de sus miembros, pero homogénea con respecto a sus funciones de transposición, codificadas en los genes *tnpA* (transposasa) y *tnpR* (resolvasa). En forma similar a IS26, la transposición es replicativa, y se produce mediante el mecanismo de *copy-in*, lo cual contribuyó fuertemente a la proliferación y el éxito evolutivo de los transposones de esta familia. Brevemente, la replicación del transposón ocurre durante la integración al sitio blanco y se genera un cointegrado intermediario en el cual las moléculas dadora y blanco están fusionadas por dos copias del transposón, localizadas en el mismo sentido. Luego, la resolvasa (una recombinasa sitio-específica) resuelve el cointegrado mediante recombinación entre las dos copias del transposón, en un sitio específico denominado *res* (*resolution site*)^{41,42}.

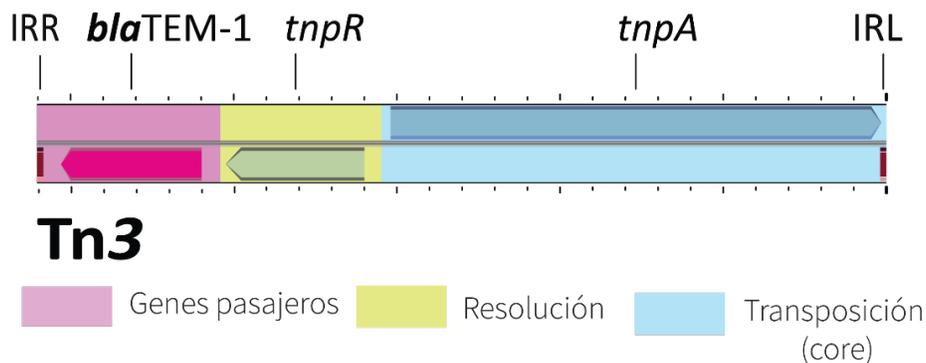


Figura 12. Estructura del Tn3. La línea gris representa la secuencia del Tn3 (4957 pb; número de acceso de GenBank: V00613). Los genes se representan con flechas horizontales, en orientación directa por encima de la línea gris y en orientación opuesta por debajo. Con barras horizontales rojo oscuro se señalan los IRL e IRR de los extremos del transposón. Los tres módulos (Transposición, Resolución y Genes pasajeros) que caracterizan a los miembros de la familia Tn3 se indican con recuadros rosa, celeste y verde respectivamente.

El Tn3 es el arquetipo de la familia Tn3, y está compuesto por los tres módulos que caracterizan la estructura de los miembros de esta familia, y que constituyen un sistema altamente versátil de plasticidad genómica, permitiendo el ensamblado y reordenamiento de genes. Estos módulos incluyen: el módulo *core* de transposición (*tnpA*), que es el que caracteriza la movilidad de esta familia; el módulo de resolución del cointegrado (*tnpR* y sitio *res*), y el módulo de genes pasajeros, que solo contiene *bla*_{TEM-1} en el Tn3, pero puede incluir varios genes de RAM (resistencia múltiple), e incluso otros genes que confieren nuevas capacidades metabólicas (Figura 12). Algunos miembros de la familia Tn3 solo contienen el módulo de transposición, en una estructura muy similar a las de la mayoría de las ISs (IRL-*tnpA*-IRR).^{41,42}

Dentro de los transposones derivados del Tn3, es necesario destacar el Tn1331, ya que, además de *bla*_{TEM-1} propio del Tn3, contiene los genes *bla*_{OXA-9} (β-lactamasa de espectro ampliado, como *bla*_{TEM-1}), *aadA* y *aac(6′)-Ib*, que confieren resistencias adicionales a aminoglicósidos: estreptomicina, espectinomicina, ampicilina, kanamicina y tobramicina (Figura 13).⁴³

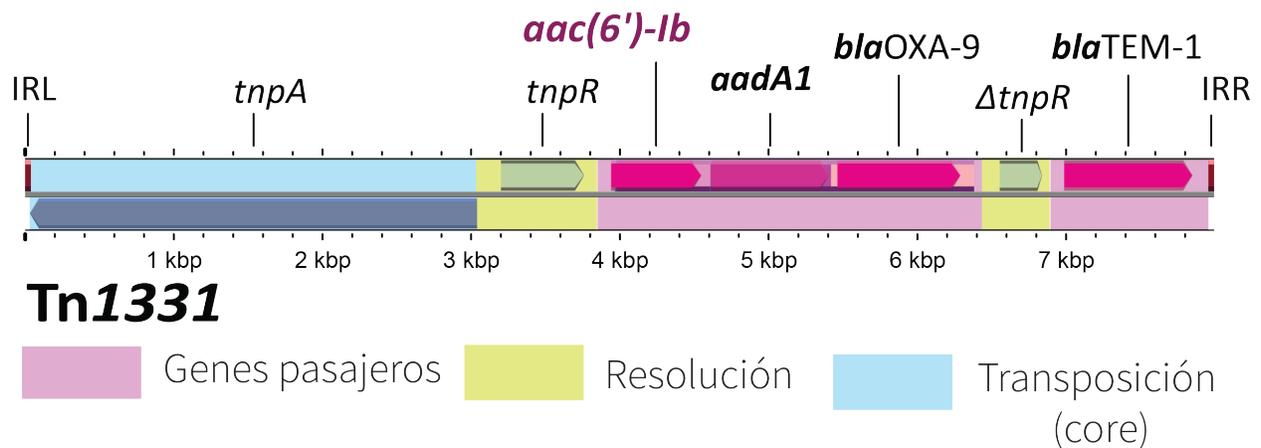


Figura 13. Estructura del Tn1331. Las referencias son las mismas señales para la figura 12. El Tn1331 contiene 7996 pb; número de acceso de GenBank: AF479774. $\Delta tnpR$ es una duplicación de la región 3' de *tnpR*.

También existe una base de datos, denominada *TnCentral*, que registra los transposones que se van caracterizando a lo largo de los años.¹⁴

(d) Sistema integrón/casete

Los **integrones** son plataformas genéticas que le permiten a la bacteria capturar, escindir, reordenar, almacenar y expresar genes mediante eventos de recombinación sitio-específica, mediados por la actividad de una integrasa (IntI), una enzima perteneciente a la familia de las tirosin-recombinasas. La estructura básica de un integrón consiste en: el gen *intl*, que codifica para la integrasa; un sitio denominado *attI*, donde se produce la recombinación, localizado adyacentemente a *intl*, y uno, o dos, promotores (Pc) que permiten la expresión de los genes integrados, que se encuentran como casetes.⁴⁴ Los casetes son elementos móviles de

aproximadamente 1 kb, que contienen un gen, u ocasionalmente dos, unido a un sitio de recombinación llamado *attC*, necesario para la integración. Por lo general, los casetes no suelen contener secuencias promotoras y se propuso que pueden existir en forma libre, como elementos circulares móviles no replicativos. La inserción y escisión de los casetes se produce en el sitio *attI*, mediante un proceso reversible de recombinación sitio-específica entre el *attI* del integrón y el sitio *attC* del casete (*attI X attC*) (Figura 14). Ambos sitios poseen una secuencia de 7 pb consenso 5'-GTTRRRY.¹⁴⁴⁴ La integración es catalizada por IntI, produciendo un corte entre la G y la primera T de la secuencia consenso. Además de la secuencia consenso, los sitios *attC* y *attI* presentan una estructura secundaria específica, que permite el reconocimiento por la integrasa y la inserción del casete en la orientación correcta, es decir río abajo del *attI* permitiendo así la expresión mediante el Pc.⁴⁵

Existe una gran variedad de genes de RAM incluidos en casetes de IC1: (i) aminoglicósidos: *aad*, *aac*, *aph*; (ii) quinolonas: *qnrVC*; (iii) aminoglicósidos y quinolonas: *aac(6')-Ib-cr*; (iv) β -lactamasas: Clase A: *carb*, *ges*, *veb*, *bel-1*; Clase B: *imp*, *vim*, *gim-1*, *sim-1*, *dim-1*, *tmb-1*; Clase D: *oxa*; (v) cloranfenicol: *cat*, *cml*; (vi) macrólidos y lincosamidas: *ereA*, *linF*; (vii) rifampicina: *arr*; (viii) trimetoprima *dfrA*, *dfrB*. Se pueden integrar diversos casetes en un integrón (hasta la fecha, el máximo reportado es de ocho), creando un arreglo de múltiples genes de RAM, y pudiendo generar así un integrón con multirresistencia.^{14, 45}

La actividad de IntI1 está regulada por LexA (regulador de la respuesta SOS), que se une a un sitio bloqueando la caja -10 del promotor del gen de la integrasa, reprimiendo así su expresión. Si la respuesta SOS se activa, se desbloquea la represión y aumenta la actividad de IntI1, permitiendo el intercambio de diversos casetes y por lo tanto una adaptación adecuada al ambiente. La formación de ADN monocatenario en la conjugación biparental también favorece la recombinación del sitio *attC*.^{44, 45, 46}

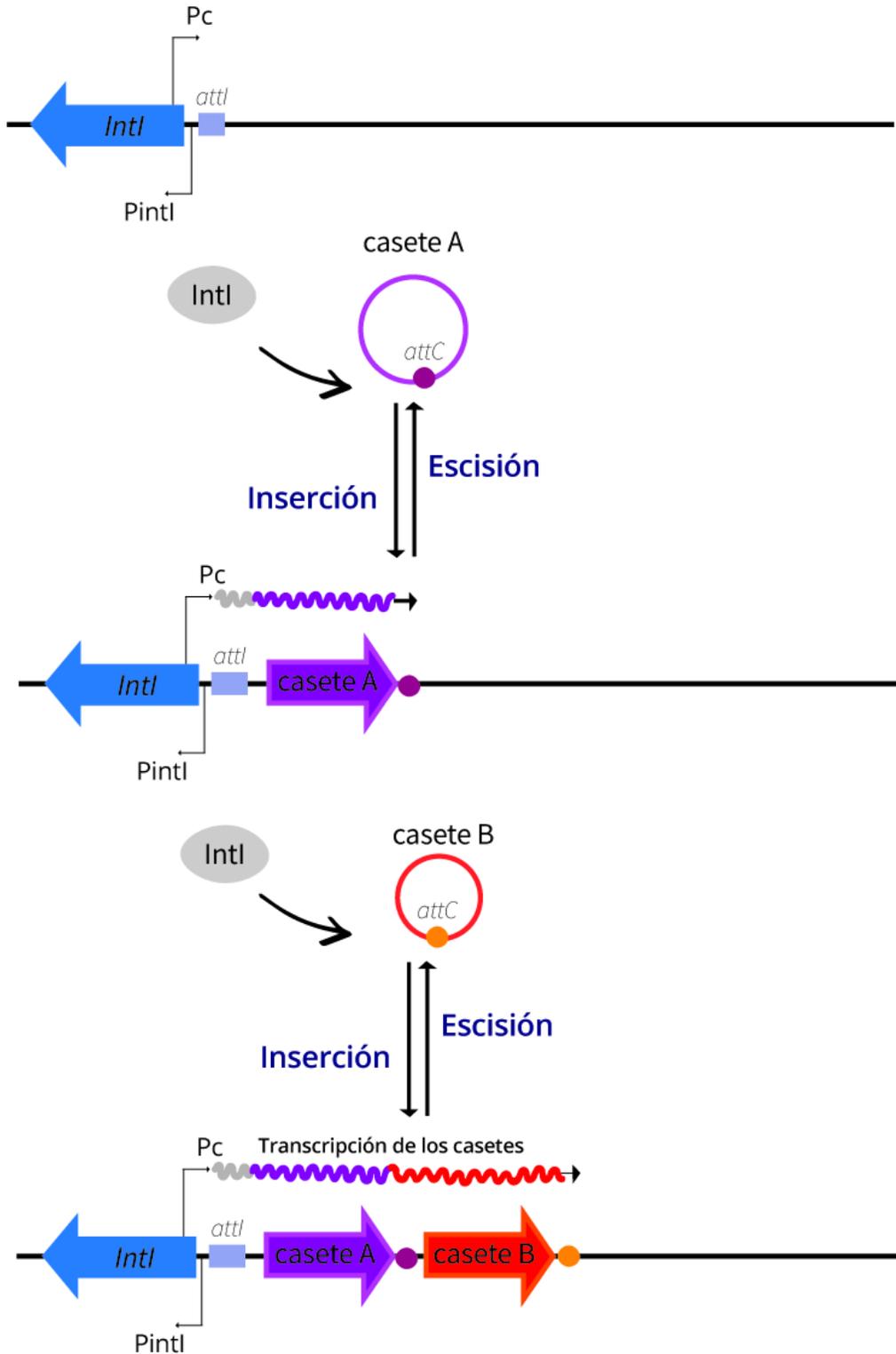


Figura 14. Estructura de un integrón e integración de cassetes mediante recombinación homóloga sitio-específica.

(e) Clasificación de los Integrones

Estudios metagenómicos indican que existen cientos de clases de integrones, que son estructuras muy antiguas y muestran una gran diversidad de casetes. Estos elementos son claves en la evolución de las bacterias para adaptarse al ambiente, teniendo de esta manera, un rol central en la diseminación de RAM. ⁴⁶

Existe una categoría de integrones conocida como “integrones cromosómicos”, que tienen la misma estructura básica de los integrones, pero con algunas particularidades: son los más abundantes, los de mayor tamaño descritos (con decenas o cientos de casetes), no son movilizables y están en el cromosoma de un gran número de bacterias Gram negativas. Si bien la mayoría de los integrones se encuentran en cromosomas, existe la excepción de los integrones móviles, también denominados integrones de resistencia, ya que generalmente están asociados a plásmidos y transposones y suelen portar genes de RAM. Este grupo de integrones son los más estudiados y se clasifican en tres clases (1 a 3), según la secuencia de su integrasa. ⁴⁶

Los **integrones de clase 1** (IC1s) son los que presentan mayor diversidad de casetes de RAM. Las reconstrucciones evolutivas sugieren que el ancestro de los IC1s estaba localizado en el cromosoma y fue movilizado por un transposón de la familia del Tn402, el cual portaba un gen *qacE*, que confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario. Este Tn402 ancestral se habría insertado en otro transposón similar al Tn21, con resistencia a mercurio, generando una deleción en *qacE*, para formar la región *qacEΔ1-sul1*, que constituye uno de los segmentos conservados en todos los IC1s. Actualmente, los IC1s están extensamente diseminados por todos los continentes, incluida la Antártida. ^{44, 45, 46}

La estructura de los IC1s contiene dos regiones conservadas: (A) la secuencia conservada 5' (5'CS, por *5' conserved sequence*), que contiene el gen *int1*, el sitio *attI* y uno, o dos, promotores, y (B) la secuencia conservada 3' (3'CS, por *3' conserved sequence*), que tiene los genes *qacEΔ1* y *sul1*, que confieren resistencia a los compuestos de amonio cuaternario y a las sulfonamidas, respectivamente, seguidos por el ORF5, de función desconocida (Figura 15A). En los IC1s existen una gran variedad de casetes con genes de resistencia para diferentes familias de antibióticos y como estos casetes se adquirieron de diversas fuentes, tienen los sitios *attC* más diversos. Contienen de uno a ocho casetes que se expresan con el promotor del 5'CS. Esta característica es importante, ya que los genes de RAM pueden generar un costo fisiológico muy alto para el hospedador, y los integrones otorgan una ventaja evolutiva, modulando más eficientemente la expresión de genes mediante la integración y escisión de casetes, lo cual permite adaptarse a los condicionantes del ambiente y la presión de selección. ^{44, 45} Los IC1 se identifican con números consecutivos según su aparición y a los integrones que no poseen casetes se los designa como In0.

Cuando se describió el In6, se identificaron los **integrones de clase 1 complejos** (ICC1s). A diferencia de los IC1s, los ICC1s contienen dos nuevos segmentos altamente conservados en todas las estructuras: una región común (CR) y una duplicación del 3'CS. Las dos copias resultantes de esta duplicación se denominaron 3'CS1 (adyacente a la región de casetes) y 3'CS2. Además, entre la CR y 3'CS2 existe otra región variable, que contiene genes de RAM y se denominó *vr-2*, ya que la región de casetes se consideró la primera región variable, o *vr-1* (Figura 15B).⁴⁶

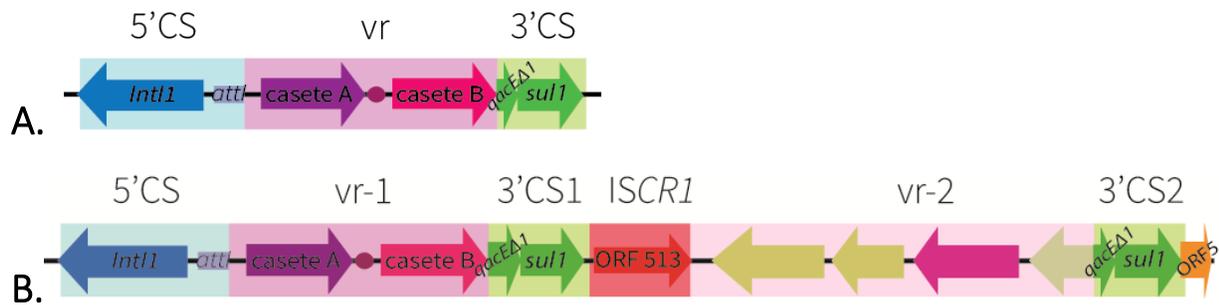


Figura 15. Estructura de los integrones A. Estructura de un integrón de clase 1. B. Estructura de un integrón de clase 1 complejo.

Cuando se analizaron los primeros ICC1s descritos, se observó que las secuencias de la CR eran idénticas en todos los casos, y contenían un ORF de 1.542 pb no descrito previamente, que se denominó *orf513*, por el número de aminoácidos del producto proteico deducido del mismo. Esta posible proteína tiene motivos conservados similares a las transposasas de la familia *IS91*, que incluye *IS91*, *IS801* e *IS1294*, las cuales se movilizan mediante replicación por círculo rodante. Estas ISs son atípicas, y no contienen IRs como otras ISs. Por el contrario, están limitadas por dos fragmentos que corresponden a un origen de replicación (*oriIS*), ubicado río abajo del gen de la transposasa, y una secuencia de terminación de la replicación (*terIS*), localizada río arriba del mismo gen. Además, no generan TSD. Si durante la replicación, la transposasa falla en reconocer el sitio *terIS*, el proceso continúa replicando la región adyacente y, de esta manera, puede movilizar genes flanqueantes al sitio de inserción de la IS.^{45, 46} Además de la similitud con los motivos conservados de las transposasas de la familia *IS91*, la región CR también contenía una secuencia muy similar al *oriIS*, aunque no se observó ninguna secuencia similar al *terIS*.⁴⁷ Por estos motivos, Toleman y col. propusieron que CR era un nuevo miembro de la familia *IS91*, al cual denominaron *ISCR1*, y además postularon un modelo que explicaba el origen de los ICC1s.⁴⁷

El modelo de Toleman propone que un ancestro de *ISCR1* se insertó, mediante transposición, río abajo del *orf5* del 3'CS de un IC1 (Figura 16). Luego, algún evento produjo la deleción del sitio *terIS* y del extremo del 3'CS que contenía *orf5*, generando un 3'CS más corto. Seguidamente se produjo replicación aberrante de *ISCR1*, debido a la ausencia del *terIS*, generándose intermediarios de diferentes longitudes, uno de los cuales contenía el *ISCR1* que se conoce actualmente (sin el *terIS*), más el extremo adyacente, es decir el 3'CS truncado. Luego este intermediario transpuso a una localización que contenía un gen de RAM, y por la misma

ausencia de *terIS*, se generó un nuevo intermediario circular, que contenían el gen de RAM. Mediante recombinación homóloga entre el 3'CS del intermediario circular y el de un IC1, se originó un ICC1. Este modelo también está sustentado por observaciones experimentales. En primer lugar, todos los ICC1s conocidos actualmente contienen 3'CS1 idénticos, mientras que la longitud del 3'CS2 es variable, dependiendo de la *vr-2* presente en cada caso, lo cual es compatible con eventos de captura génica independientes. En segundo lugar, para diversos ICC1s se pudo demostrar que las regiones completas contenidas en sus *vr-2* (incluyendo genes de RAM y sus secuencias adyacentes) tenían muy alto grado de identidad con regiones continuas de cromosomas bacterianos, lo cual señala las fuentes de las que provienen dichas *vr-2*.^{44, 45, 46}

Los genes de RAM descritos en la *vr-2* de ICC1 son: (i) aminoglicósidos: *armA*; (ii) β -lactamasas: Clase A: *ctx-m*, *per-1*, *veb-3*; Clase B: *ndm-1*; Clase C: *dha-1*, *cmv*, *mox-1*, *fox-4*; (iii) cloranfenicol: *catA2* (alelo distinto a los encontrados en la *vr-1*); (iv) quinolonas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrVC6*; (v) trimetoprima: *dfrA* (alelos distintos a los encontrados en la *vr-1*). Es importante recalcar que la *vr-2* constituye un nuevo punto de adquisición de genes de RAM, y que los genes encontrados en la *vr-2* no se encuentran en la *vr-1*, y viceversa, con la única excepción de *qnrVC6*. Este hecho multiplica las posibilidades de combinación de genes de RAM en un único ICC1, con enorme impacto en la generación de multirresistencia y la epidemiología de la RAM.⁴⁶

Los **integrones de clase 2** contienen menor cantidad y diversidad de casetes de RAM, los cuales suelen incluir los genes *dfrA*, *aadA* y *sat*, que confieren resistencia a trimetoprima, estreptomicina/espectinomicina y estreptotricina, respectivamente. La *intI2* es generalmente no es funcional debido a un codón de terminación de la transcripción interno. Por último, los **integrones de clase 3** son los menos frecuentes entre los integrones de resistencia y su integrasa (*IntI3*) posee 60% y 47% de similitud con *IntI1* e *IntI2*, respectivamente.^{44, 45}

Además de los diferentes tipos de integrones mencionados, pueden encontrarse estructuras constituidas por *attCs* agrupados que carecen de un gen de integrasa, y que se denominan CALIN (por *Clusters of attCs lacking an integron-integrase*). Es decir, estas estructuras están formadas por arreglos de casetes que no contienen un gen *intI1* asociado. Los CALIN pueden formarse por varios mecanismos, como la inserción/escisión de casetes, mediada por la *IntI1* de un IC1 localizado en otra parte del genoma, o bien, por pérdida de *intI1* debido a reordenamientos genómicos que separan este gen de su grupo de *attCs* asociado.^{44, 45}

Existe una base de datos pública de integrones denominada *Integrall*, que permite la identificación y clasificación de secuencias que contienen integrones. Si bien no se actualiza de manera muy frecuente, la última actualización del 8 de septiembre de 2021 contenía 1509 genes de integrasas y 8562 casetes.^{14, 45}

Ancestro de ISCR1:

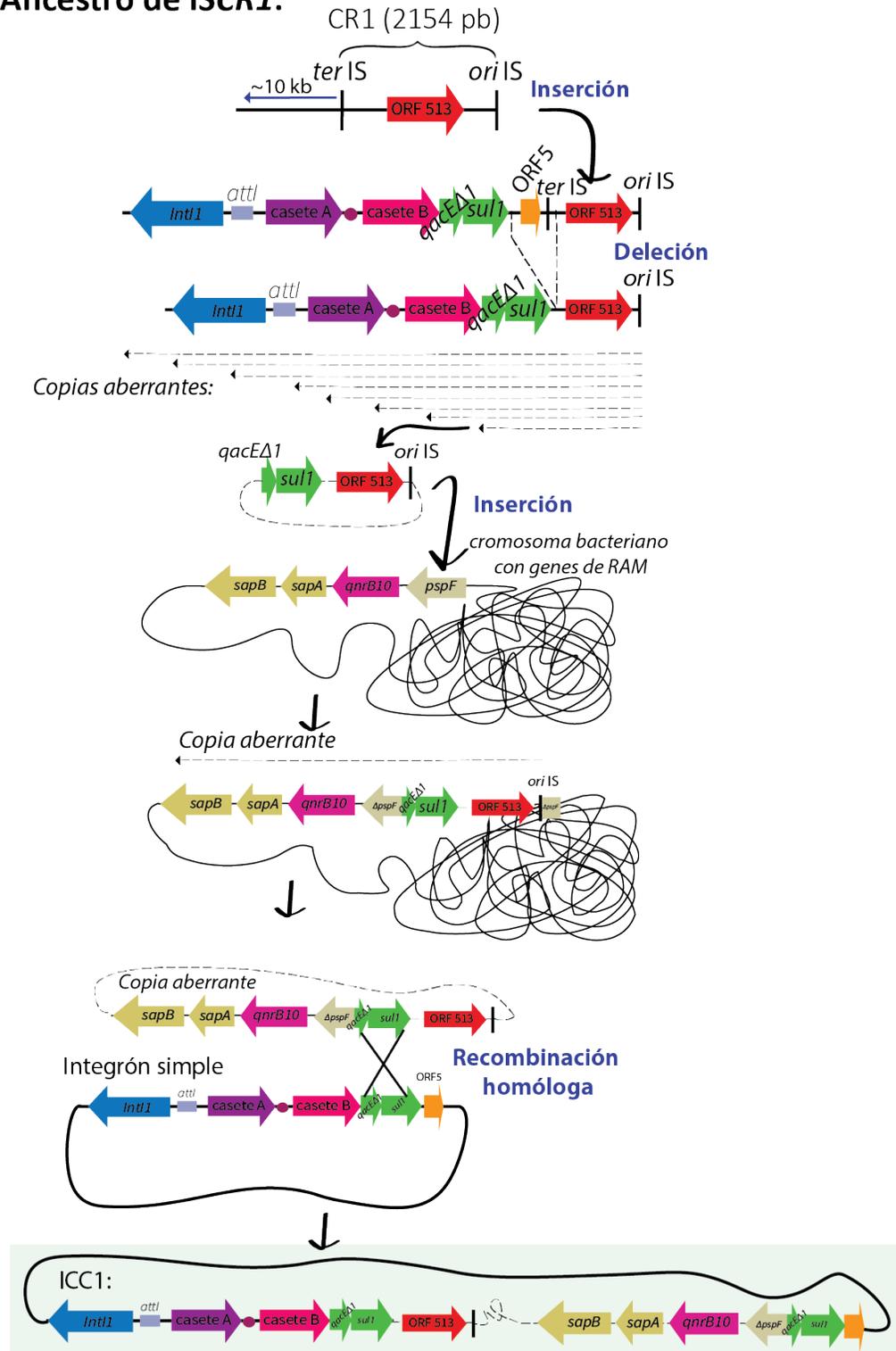


Figura 16. Modelo de Toleman que explica el origen de integrones de clase 1 complejos (ICC1). La flecha horizontal azul en el ancestro de ISCR1 indica la longitud del fragmento adyacente a *terIS* que podría replicarse si la transposasa falla en reconocer dicho sitio (replicación aberrante). Para mejor comprensión, las copias aberrantes generadas por la falta del *terIS* en ISCR1 (flechas de líneas punteadas) se muestran en forma lineal, aunque son circulares.

Sección 1.05 Mobiloma y su rol en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos

Un genoma bacteriano está compuesto por el cromosoma (o más de uno, en algunas especies), que se puede considerar como el Genoma Principal, y puede, o no, contener también plásmidos, que pueden considerarse como el Genoma Secundario. Es conveniente pensar al Genoma Principal como un mosaico compuesto por una “columna vertebral” que contiene el genoma central con todos los genes esenciales de mantenimiento, intercalados con una gran variedad de genes accesorios. Estos últimos, en conjunto con el Genoma Secundario, constituyen lo que se denomina “mobiloma”, que contiene una gran variedad de EGMs (Figura 17).⁴⁸

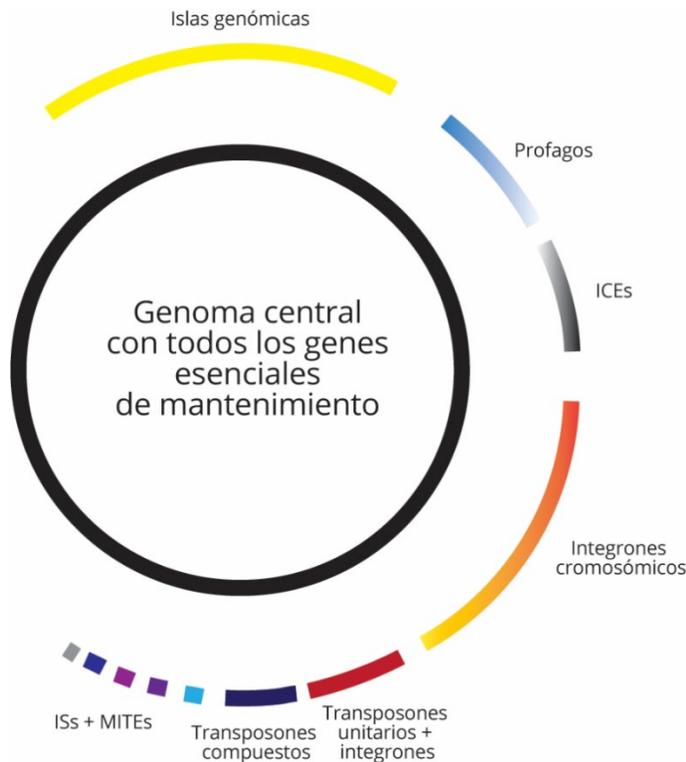


Figura 17. Componentes del mobiloma en el Genoma Principal (cromosoma).

Las infecciones causadas por organismos multirresistentes aumentan significativamente la morbilidad, la mortalidad y los costos de atención médica. La captura, acumulación y diseminación de los genes de RAM se deben en gran parte a las acciones de estos EGMs, quienes promueven la movilidad del ADN intracelular (del cromosoma a un plásmido, o entre plásmidos) e intercelular (de bacteria a bacteria). Se puede decir que la interacción entre los diversos tipos de EGMs es el sustento de la rápida evolución en los diversos patógenos multirresistentes a los antibióticos. Comúnmente, los genes de RAM están codificados en EGMs, lo cual les permite movilizarse entre diferentes ubicaciones genéticas y acumularse en un mismo microorganismo, generando así multirresistencia (Figura 18)^{14, 49}

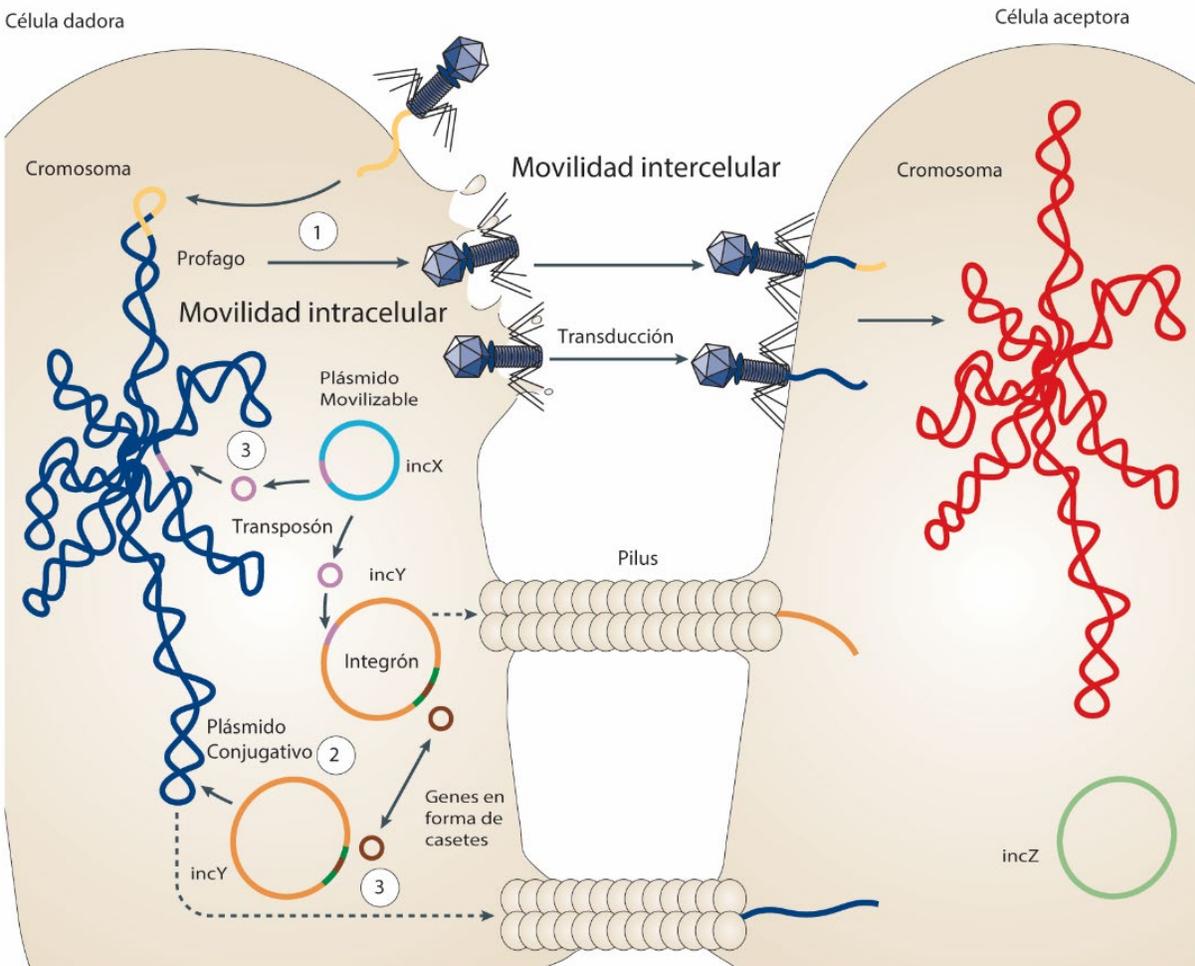


Figura 18. Diferentes elementos genéticos móviles y su rol en la movilidad inter- e intracelular de genes de resistencia a los antimicrobianos. 1) Transducción: el ADN (en amarillo) ingresa a través de un profago y se inserta en el cromosoma (en azul oscuro), el ADN se replica, profago empaqueta su propio ADN o el del hospedador y puede lisar e infectar células receptoras. 2) Conjugación: plásmidos conjugativos grandes y de bajo número de copias (en naranja) e ICEs (no se muestran) utilizan el *pilus* para establecer una conexión con la célula receptora y transferirse a la célula receptora. 3) Transposición: los transposones (en violeta) pueden integrarse en nuevos sitios como en el cromosoma o plásmidos por recombinación no homóloga. Los integrones (verde oscuro) usan similares mecanismos para intercambiar casetes (en marrón). Esquema adaptado de referencia ⁴⁹.

Sección 1.06 Recombinación Homóloga

La recombinación homóloga es un proceso biológico que ocurre en casi todas las células, que implica el intercambio de las cadenas de ADN entre regiones que comparten un alto grado de similitud entre sí. Este proceso está catalizado por una enzima muy conservada, denominada

RecA, y tiene un rol fundamental en todos los microorganismos para la reparación del ADN y la diversificación de los genomas bacterianos. La recombinación entre alelos genéticamente relacionados, permite la adquisición de mutaciones adaptativas, o elimina las deletéreas, facilitando la adaptación a diferentes ambientes. Además, la recombinación homóloga permite la integración de ADN exógeno homólogo que ingresó en la célula mediante algún mecanismo de transmisión horizontal, por ejemplo, mediante transformación o transducción, es decir, la adquisición de nuevos genes. Por último, también interviene en la reorganización de los genomas, a través de deleciones, inserciones e inversiones, contribuyendo en la plasticidad genómica. Por lo tanto, este proceso tiene un rol crucial en la evolución y adaptación de las bacterias.^{50, 51}

Brevemente, la recombinación homóloga comienza con la generación de un corte en ambas cadenas de una de las dos regiones de ADN en las que ocurrirá el proceso. Este corte se produce mediante la acción de la enzima “presináptica” denominada RecBCD (producto trimérico de los genes *recB*, *-C* y *-D*), que tiene actividades de helicasa y nucleasa. Es decir, RecBCD actúa sobre la doble cadena de ADN para hacerla accesible a RecA. Al unirse RecA con el ADN simple cadena, cataliza el intercambio de las cadenas homólogas generando un intermediario. Finalmente, la enzima RuvC, junto con otras proteínas, resuelve el intermediario ligando los fragmentos de la nueva molécula recombinante (Figura 19).⁵² Si el intercambio de cadenas de ADN ocurre entre moléculas de ADN diferentes, puede ocurrir una recombinación simple o doble, generando diferentes estructuras en las moléculas resultantes de cada caso (Figura 20). En cambio, si la recombinación ocurre entre segmentos homólogos dentro de una misma molécula, pueden obtenerse dos resultados diferentes, dependiendo de la orientación de dichos segmentos: (a) cuando tienen la misma orientación, el fragmento comprendido entre ellos se escinde, y (b) si la orientación de los segmentos homólogos es opuesta, el fragmento comprendido entre ellos se invierte (ver Figura 20).⁵¹

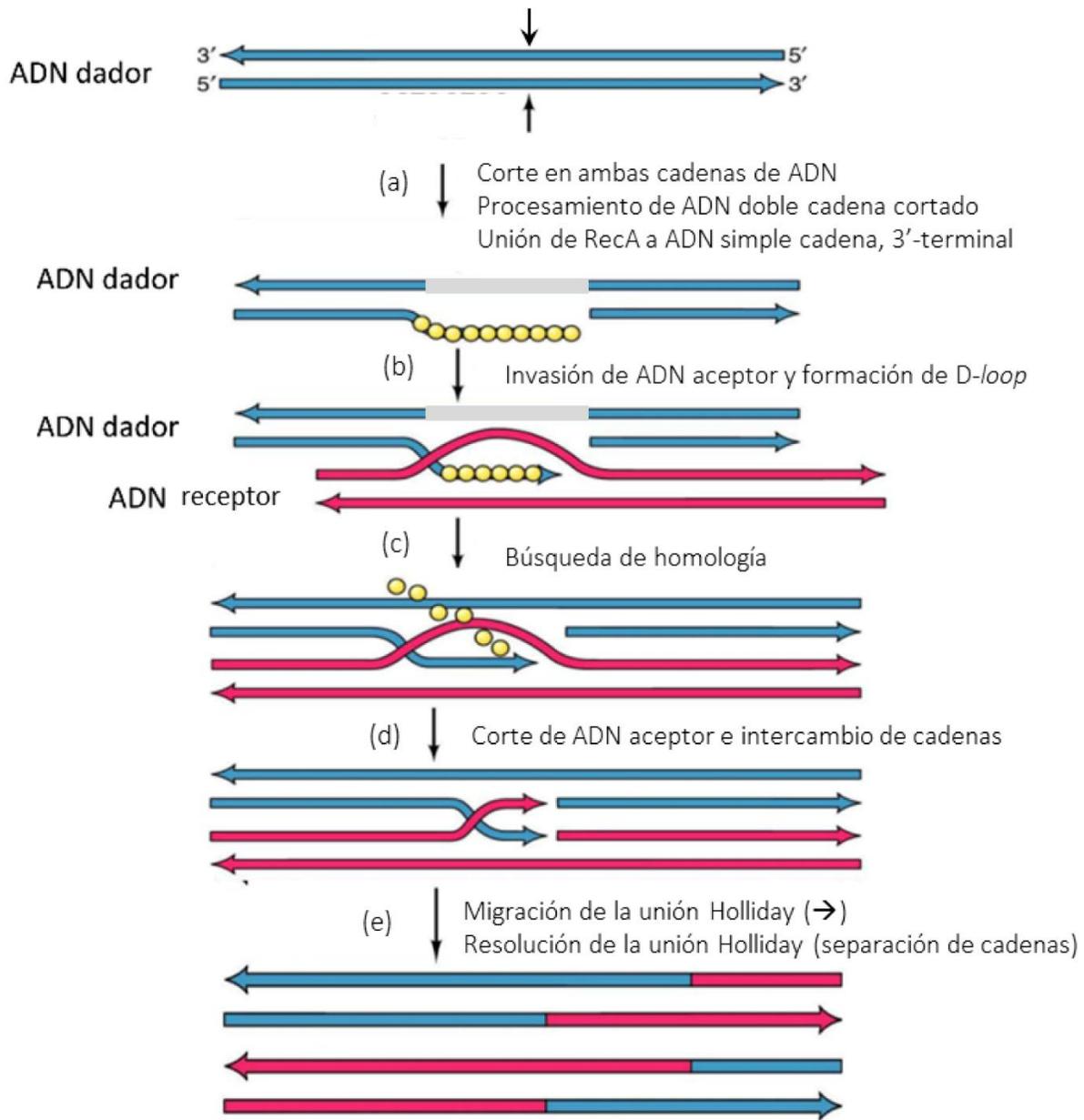


Figura 19. Mecanismo de recombinación homóloga. La proteína RecBCD (para mayor claridad no se representa en la imagen), genera un corte en ambas cadenas de uno de los segmentos de ADN que intervienen en la recombinación, considerado aquí como dador (azul). (a) La actividad de helicasa de RecBCD desenrolla una de las cadenas del ADN dador, y degrada la otra con la actividad de nucleasa, generando una "cola" de ADN simple cadena, 3'-terminal, que se recubre con RecA (esferas amarillas). (b) RecA invade el otro ADN doble cadena, considerado aquí como receptor (rosa), formando un D-loop. (c) RecA busca en el ADN receptor, una región con homología con la cola de ADN simple cadena, 3'-terminal. (d) Luego de que se encuentra la región de homología, se genera un corte en la cadena de ADN que contiene el D-loop, permitiendo que la cola de ADN simple cadena, 3'-terminal del dador se una por complementariedad de bases con la cadena no cortada del ADN receptor. (e) Los gaps remanentes se llenan y los cortes se sellan mediante la ADN ligasa, resultando en un complejo de cuatro cadenas con una unión Holliday. Se produce la migración de esta unión (hacia la derecha en la figura), mediada por la actividad de las proteínas RuvA y RuvB. Finalmente, RuvC resuelve la unión Holliday en dos moléculas separadas.

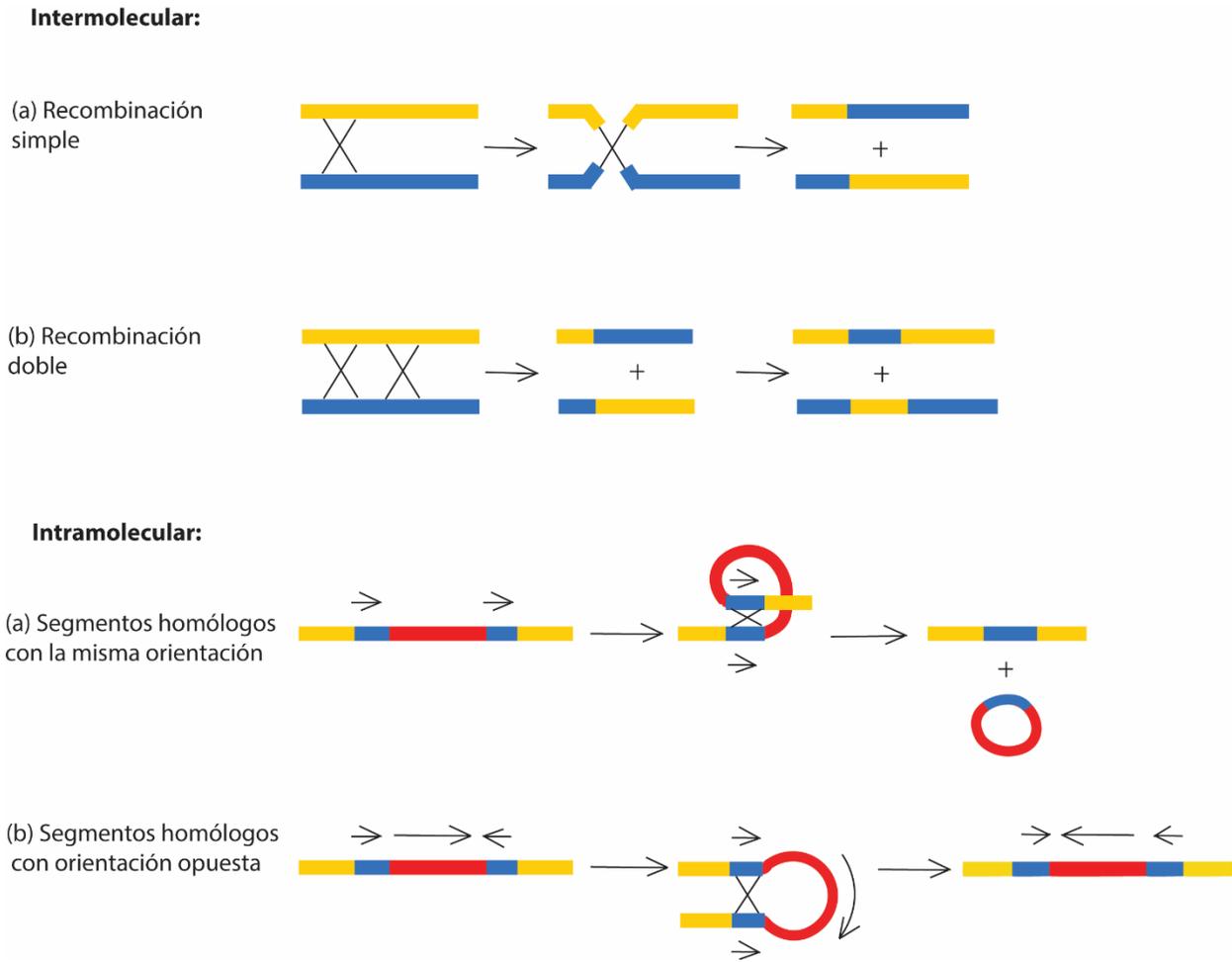


Figura 20. Estructuras resultantes de recombinación homóloga inter- e intramolecular. Las X's representan los eventos de recombinación entre dos segmentos de ADN homólogos. En el esquema de la recombinación intramolecular, estos dos segmentos homólogos están representados con barras azules, y la barra roja indica el fragmento comprendido entre ellos. Las flechas indican la orientación de estos tres elementos.

Sección 1.07 CRISPR-Cas

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated protein (CRISPR-Cas) es un sistema inmune adaptativo que se puede encontrar en genomas de bacterias y archaeas. Consiste en una región con repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas de manera regular e interespaciadas, asociadas a sus proteínas Cas. Este sistema ayuda a proteger a la bacteria contra bacteriófagos y plásmidos invasivos, limitando la adquisición de material genético exógeno. En general, los *loci* CRISPR-Cas están compuesto por un segmento de ADN que contiene secuencias cortas y repetidas de 21 a 47 pb casi idénticas, separadas por fragmentos denominados espaciadores, que constituyen un registro cronológico del ADN “extraño, o

foráneo”, del cual la bacteria necesita protección, por ejemplo, EGMs como bacteriófagos. Además, contiene un conjunto de genes Cas y una secuencia conservada de 100 a 500 pb aproximadamente, rica en A y T, que aparentemente funciona como promotor de la transcripción del arreglo CRISPR (Figura 21).⁵³

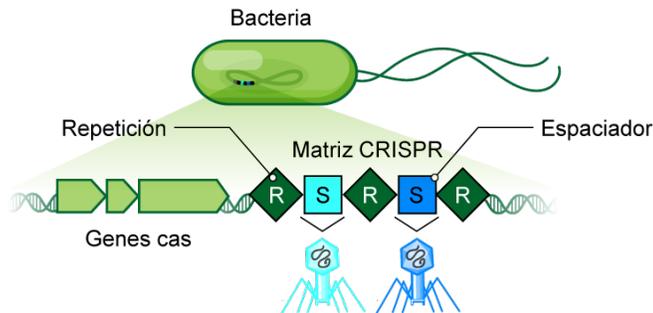


Figura 21. Elementos de un sistema CRISPR-Cas. Los colores de los espaciadores indican que provienen de distintos EGMs invasores, en este caso, fagos.

En el mecanismo de acción de un sistema CRISPR-Cas, se genera un transcripto que permite a las proteínas Cas identificar a los ácidos nucleicos blanco, y producir su clivaje. Este proceso ocurre en etapas, comenzando por la Adaptación, en la cual se insertan los nuevos espaciadores en el locus de CRISPR, proporcionando la memoria genética. Luego, el sistema se prepara para la acción, mediante la expresión de los genes Cas y generando los transcriptos del CRISPR, que serán los blancos de las proteínas Cas encargadas del clivaje de las moléculas invasoras. En la última etapa, denominada Interferencia, el ARN transcripto se procesa y madura, formando junto con las proteínas Cas y sus factores accesorios, un complejo ribonucleoproteico, o módulo efector, el cual reconoce el ácido nucleico blanco y lo destruye (Figura 22) ^{53, 54}

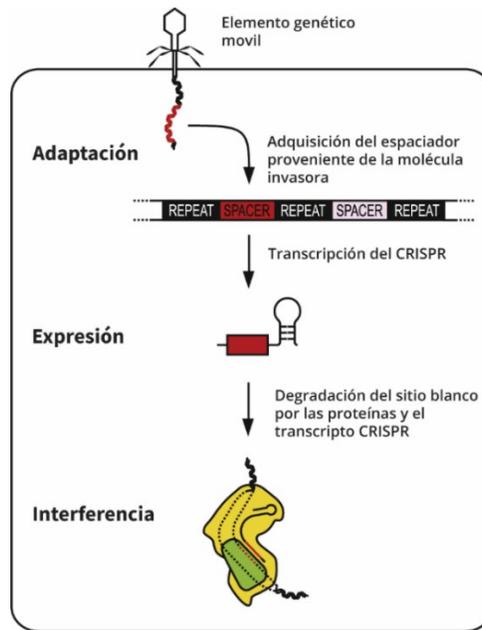


Figura 22. Etapas del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas.

La clasificación de los sistemas CRISPR-Cas es compleja, pero en resumen se pueden catalogar en dos clases, según si el módulo efector utiliza varias proteínas Cas (clase 1), o una sola, con múltiples actividades enzimáticas (clase 2). Además, se tipifican del I al VI: los tipos I y II proporcionan inmunidad contra ADN, mientras que los del tipo III también pueden hacerlo contra ARN. Los del tipo IV al VI se describieron recientemente y, por lo tanto, son los menos estudiados.⁵³ Se detallan a continuación los sistemas de CRISPR-Cas tipo IV (CRISPR-Cas-IV), ya que son pertinentes para este trabajo. Tienen la particularidad de estar guiados por la interacción entre el ADN y el módulo efector. Se describieron sólo 3 variantes de los sistemas CRISPR-Cas-IV, según los espaciadores que los componen: IV-A, IV-B y IV-C. Todas ellas están codificadas, en mayor medida, en plásmidos bacterianos, aunque también se encontraron en profagos. Todos los CRISPR-Cas-IV tienen en común que carecen del módulo de adaptación, es decir, las proteínas Cas1 y Cas2. Se cree que el complejo proteico Cas1-Cas2 se encargaría de transportar el material espaciador y realizar la integración.⁵⁵

Una hipótesis sugiere que CRISPR-Cas-IV constituye el origen evolutivo de los sistemas CRISPR-Cas: un ancestro habría ganado funcionalidad al asociarse con a un transposón que contenía los genes codificantes de las proteínas Cas1 y Cas2, y luego fue evolucionando, aunque retuvo las regiones repetidas. La proteína Cas 1 duplicó estas secuencias, y agregó los espaciadores, resultando en los sistemas CRISPR-Cas tipo I y III conocidos actualmente.^{53, 54}

Los primeros plásmidos que se describieron en enterobacterias, asociados a genes de RAM y CRISPR-Cas-IV, tenían replicones del tipo FIB, pero la mayoría contenían también un replicón HI1B adicional. La mayoría de estos plásmidos tienen un tamaño mayor a 200 kb, y con un arreglo CRISPR compuesto por repeticiones directas de 23-30 pb, separadas por secuencias espaciadoras de 21-47 pb (Figura 23).⁵³



Figura 23. Región CRISPR-Cas tipo IV encontrada en un plásmido de Enterobacteriales. Los genes de las proteínas Cas están representados por flechas de colores rojizos. En el extremo izquierdo de la región CRISPR, se encuentra un segmento de 130 pb rico en AT (rectángulo negro) que actúa como secuencia líder de CRISPR. Los rombos azules del arreglo CRISPR representan las repeticiones directas, y los rectángulos de colores, los espaciadores. En el extremo derecho del arreglo, se encuentra codificada una transcriptasa reversa (*RTase/maturase*). Los genes *cas1* y *cas2* no están presente en los CRISPR identificados en plásmidos.⁵³

En un trabajo publicado en 2022, se realizó una búsqueda de sistemas CRISPR-Cas en secuencias de plásmidos no redundantes, obtenidas de la base de datos PLSDB: se encontraron 13.265 CRISPR-Cas en bacterias y 253 en archeas. Estos sistemas se encontraron en diversos grupos de plásmidos, siendo el grupo IncHI1B el de mayor frecuencia (Figura 24B).⁵⁶ Además, el 47% de los plásmidos portadores de un sistema CRISPR-Cas completo, o incompleto (sin el arreglo CRISPR, o sin las proteínas Cas), fueron conjugativos, lo que sugiere que casi la mitad de los plásmidos analizados están involucrados en la diseminación de los sistemas CRISPR-Cas dentro

del microbioma (Figura 24A). Otra característica que vale la pena destacar de estos plásmidos, es que sus tamaños fueron de 180-250 kb aproximadamente.⁵⁶

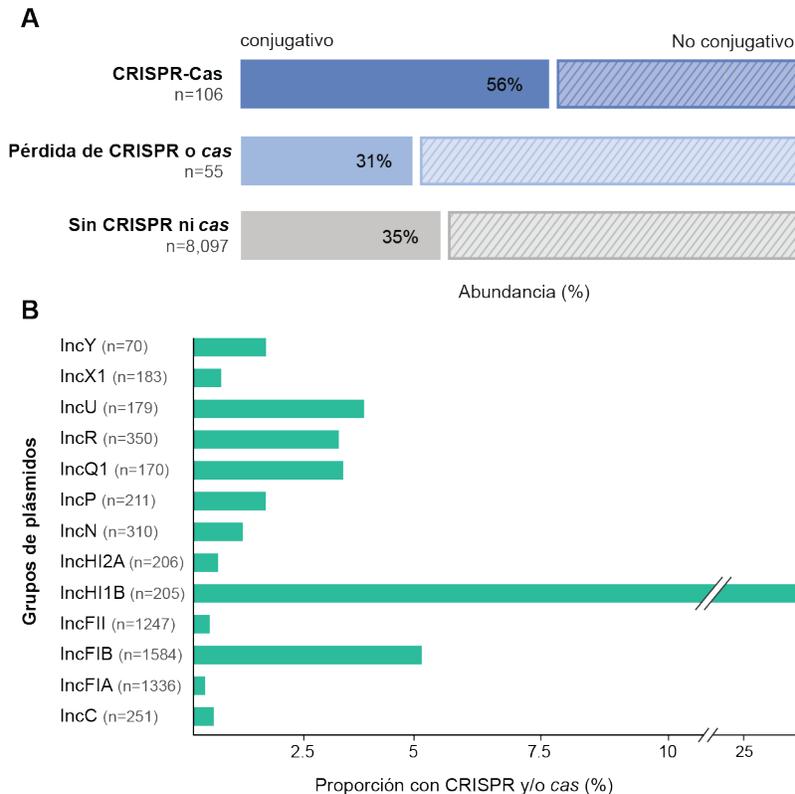


Figura 24. Distribución de plásmidos portadores de sistemas CRISPR-Cas. a) Distribución de plásmidos conjugativos en plásmidos con sistemas CRISPR-Cas, en aquellos que perdieron el arreglo CRISPR, o las proteínas Cas, y en los que no portaban ningún sistema CRISPR-Cas. b) Distribución proporcional de plásmidos portadores de CRISPR y/o Cas en distintos grupos Inc.⁵⁶

Finalmente, se identificó que el 66% de los espaciadores correspondieron a secuencias de otros plásmidos, y una porción más pequeña (27%) correspondió a secuencias virales, contrariamente a la tendencia encontrada en sistemas CRISPR-Cas codificados en cromosomas: 24% y 62%, respectivamente. Esto representa otra evidencia de la dinámica competitiva que existe entre diferentes plásmidos.⁵⁶

Sección 1.08 Quinolonas: estructura, mecanismo de acción y uso terapéutico

(a) Estructura química

Las quinolonas son una familia de antibióticos de gran relevancia clínica, y una de las más frecuentemente prescritas en el mundo⁵⁷. Está compuesta por un grupo de antibacterianos

sintéticos, es decir, no se aislaron de organismos vivos, sino que fueron obtenidos por síntesis, a diferencia de la gran mayoría de los antibióticos restantes. El primer miembro de esta familia fue el ácido nalidíxico, descubierto en 1962 por accidente, como un subproducto de la síntesis del antipalúdico cloroquina⁵⁸.

A partir de ese hallazgo, y utilizando una molécula básica muy similar al ácido nalidíxico, se diseñaron y sintetizaron una amplia gama de compuestos (Figura 25). La subsiguiente adición de un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula dio lugar a la era de las fluoroquinolonas. Este átomo de flúor aumentó en gran medida la potencia y el espectro de actividad, por lo que está presente en casi todas las moléculas de quinolonas utilizadas en la práctica clínica hasta el momento.⁵⁸

La adición de un grupo piperazina en la posición 7, como se observa en las fluoroquinolonas ciprofloxacina y norfloxacina, también incrementó la potencia frente a bacterias Gram negativas. Lo mismo sucedió con la adición de un grupo metil-piperazina, como se observa en ofloxacina, levofloxacina y gatifloxacina. La ciprofloxacina, uno de los antibióticos más importantes de esta familia, permanece como uno de los antimicrobianos más recetados después de casi tres décadas de uso clínico, y está catalogado por la OMS como un medicamento esencial y un antibiótico de importancia crítica^{57, 57}.

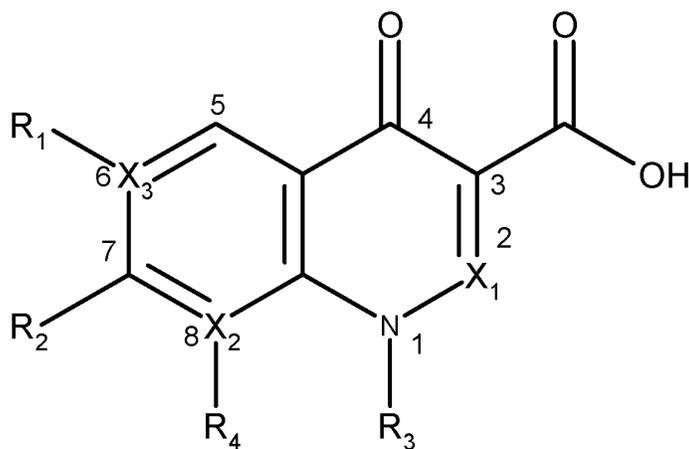


Figura 25. Estructura molecular básica de las quinolonas. La estructura formada por dos anillos se numera a partir del nitrógeno en la posición 1 y el grupo carboxilo en la posición 3.

Hasta el momento, se sintetizaron más de 10000 moléculas diferentes de quinolonas, de las cuales solo 21 tienen aprobado el uso en humanos, en la Unión Europea.⁵⁹ En Latinoamérica, el uso de las quinolonas es amplio y hasta puede considerarse indiscriminado por algunos autores.⁶⁰

La clasificación de las quinolonas se divide en 4 generaciones según su espectro de actividad: (Tabla 3)⁶¹.

Tabla 3. Clasificación de quinolonas según su espectro de actividad y sus características generales.

Quinolonas	Generación	Características Generales
Ácido Nalidíxico Ácido pipemídico	1	No contienen el átomo de flúor. Son prácticamente inactivas frente a Gram positivos, patógenos atípicos y anaerobios.
Norfloxacin	2	Mayor actividad frente a Gram negativos, incluida <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , activas frente a algunos patógenos atípicos, pero tienen moderada actividad frente a Gram positivos y prácticamente nula frente a anaerobios.
Gatifloxacin Ofloxacin Ciprofloxacina Pefloxacina Levofloxacina	3	Se suma a las características de segunda generación, una mejor actividad frente a <i>P. aeruginosa</i> , Gram positivos y patógenos atípicos
Moxifloxacina	4	Respecto a la segunda generación, mejora la actividad frente a Gram positivos y una actividad buena frente a anaerobios, aunque disminuye su actividad frente a <i>P. aeruginosa</i>

(b) Mecanismo de acción y uso clínico

Las quinolonas ingresan a la célula por difusión pasiva, a través de canales proteicos denominados porinas. Sus sitios blanco son las topoisomerasas de tipo II, ADN girasa y topoisomerasa IV, que intervienen en la modulación del superenrollamiento del ADN, interviniendo en todos los procesos que requieran la separación de la doble cadena, es decir, son indispensables para la replicación, la transcripción y la reparación del ADN. Debido al superenrollamiento, cualquier proceso que produzca la separación de sus cadenas, como el avance de las horquillas de replicación, generará una fuerte tensión estérica en la parte de la molécula que aún está como doble cadena. La ADN girasa y la topoisomerasa IV relajan esta tensión, permitiendo que el proceso de separación de cadenas continúe. Ambas enzimas se unen al ADN en el lugar donde se produce la tensión, cortan ambas cadenas en una región, pasan las dos cadenas de otra región a través del corte, y finalmente religan los extremos de las cadenas cortadas. La ADN girasa cataliza el superenrollamiento negativo del ADN, y la topoisomerasa IV actúa en la separación de cromosomas hermanos, luego de la replicación.⁶²

La estructura de estas enzimas es similar: son heterotetrámeros, constituidos por 2 subunidades A y 2 B, denominadas GyrA y GyrB, en la ADN girasa, o ParC y ParE, en la topoisomerasa IV, respectivamente. Las quinolonas se intercalan entre las subunidades A de estas enzimas, formando un complejo ternario quinolona-enzima-ADN, y las bloquean justo después de que generaron los cortes en las cadenas de ADN, de modo que no pueden hacer la religación. Esto resulta en múltiple fragmentación del ADN, lo cual dispara el sistema SOS, que contribuye al daño en el ADN, resultando finalmente en el colapso del genoma y la muerte celular. De esta manera, las quinolonas tienen una actividad bactericida dependiente de su concentración.^{62, 63}

Las quinolonas, se usan en una gran variedad de infecciones como tratamiento oral e intravenoso, demostrando eficacia clínica para infecciones del tracto respiratorio, incluidas la bronquitis crónica, neumonías adquiridas en la comunidad y sinusitis bacteriana. También tienen eficacia para el tratamiento de infecciones del tracto urinario; prostatitis bacteriana; infecciones de la piel y otros tejidos blandos; infecciones de huesos y articulaciones; infecciones gastrointestinales causadas por *E. coli* toxigénica, o ciertas especies de *Salmonella* (incluyendo fiebre tifoidea y paratifoidea, y el estado de portador crónico de *Salmonella*); infecciones por especies de *Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides*. Las quinolonas también han sido eficaces en el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual, como infecciones gonocócicas y por clamidia.⁶⁴

El éxito de los tratamientos con estas drogas llevó a una gran expansión en su uso, no sólo en medicina humana sino también en veterinaria. A pesar de que las pautas de prescripción ahora recomiendan preservar el uso de las quinolonas, el número de cepas resistentes a estas drogas creció de manera sostenida en el tiempo, y actualmente se observan en todas las especies bacterianas que se tratan con estas drogas.^{57, 62}

En Latinoamérica, se estima que dos tercios de estos antibióticos se adquieren sin receta, la mitad de los consumidores compran el medicamento para 1 día de tratamiento, y el 90% para un período de menos de tres días. Esta situación refleja un escenario poco favorable para la epidemiología de la resistencia en nuestra región.⁶⁰

Las quinolonas deben atravesar la envoltura bacteriana para interactuar con sus sitios blanco y poder producir su efecto bactericida. Existen mecanismos descritos de resistencia a las quinolonas que de manera individual o en conjunto, impiden que las drogas puedan procurar su efecto. Estos mecanismos se explican a continuación.⁵⁷

Sección 1.09 Mecanismos cromosómicos de resistencia a las quinolonas

Los primeros mecanismos de resistencia a quinolonas descritos se deben a mutaciones en el cromosoma que alteran el sitio blanco de estos antibióticos (ADNgirasa y topoisomerasa IV), o disminuyen su concentración intracelular.⁶⁰

La alteración del sitio blanco de las drogas se produce por mutaciones en regiones específicas de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parE* y *parC*, denominadas Quinolone Resistance Determining Regions (QRDR), ya que codifican para los dominios de las proteínas que interactúan con las quinolonas. Por ejemplo, las mutaciones más comúnmente observadas en bacterias Gram negativas, se observan en la región QRDR de *gyrA*, que codifica para los aminoácidos 67–106. Las

mutaciones en el gen *gyrB* son muy poco frecuentes y sólo se observan en algunas especies de Enterobacterales.⁶⁰

La adquisición de resistencia a quinolonas mediante selección de mutaciones en las regiones QRDRs es un proceso secuencial. Por ejemplo, en Enterobacterales se selecciona primero una mutación en *gyrA*, luego otra en *parC*, e incluso puede seleccionarse una tercera mutación en *gyrA*, o bien en *parC*. La primera mutación en *gyrA* produce solo sensibilidad reducida o a lo sumo resistencia de bajo nivel a ciprofloxacina (concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,125 µg/ml). Es necesaria la emergencia de una segunda mutación en *parC*, para alcanzar resistencia neta a ciprofloxacina (CIM de 2 µg/ml), o bien de una tercera mutación en *gyrA* o *parC* para tener resistencia de alto nivel (CIM de ciprofloxacina de 64 µg/ml). Finalmente, las mutaciones en *parE* son muy poco frecuentes y en la mayoría de los casos se desconoce el impacto adicional que generan en la resistencia a quinolonas.⁶⁰

Con respecto al segundo mecanismo cromosómico de resistencia a quinolonas, es decir, la disminución de la concentración intracelular de estas drogas, en primer lugar cabe recordar que las quinolonas ingresan a la célula mediante porinas. Por lo tanto, las mutaciones que causan alteraciones en la expresión de las porinas, generan una disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana. Este fenómeno puede ocurrir por ausencia de porinas, debido a inactivación génica, o bien, por regulación negativa de su expresión, o modificaciones en el tamaño del canal de las porinas.⁵⁷

En segundo lugar, otro mecanismo que disminuye la concentración intracelular de quinolonas es el incremento de la salida de la droga de la célula, lo cual puede ocurrir por hiperexpresión de bombas de eflujo. Este mecanismo generalmente se combina con una disminución de la permeabilidad, lo cual incrementa sinérgicamente los niveles de resistencia.^{63,}

65

Sección 1.10 Mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas o PMQRs

En 1998, se identificó por primera vez un mecanismo de resistencia a quinolonas en un plásmido con capacidad de transferencia por conjugación. El gen responsable de este mecanismo se denominó *qnrA*, y se identificó en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacina.⁶⁶ Estos mecanismos con capacidad de transferencia horizontal se denominaron mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas (PMQRs, por: *Plasmid mediated quinolone resistance*). Existen autores que cuestionan este término, debido a que los plásmidos pueden intercambiar material genético con el cromosoma, pudiendo integrarse en forma de fragmentos o en su totalidad dentro del mismo, como ya se describió en algunos casos. De esta manera, el concepto “mediado por plásmidos” y la abreviatura “PMQR” no serían del todo correctos, y se

sugiere reemplazarlos por “Transferible”, y “TMQR” (del inglés: *Transferible Mechanisms of Quinolone Resistance*), respectivamente.⁵⁹ Si bien en esta misma tesis se encontraron casos que avalan esta interpretación, dado que el término “PMQR” está muy instaurado en la bibliografía, se decidió conservarlo a largo de todo el trabajo.

(a) Clases de PMQRs

Los PMQRs se pueden dividir en 5 clases, que se detallan a continuación:

1. Las proteínas **Qnr** (de inglés: *Quinolone resistance*) actúan uniéndose a la ADN girasa y a la topoisomerasa IV, interfiriendo con la unión de las quinolonas y protegiendo, así, al sitio blanco de la acción de estas drogas.⁶⁰ Estas proteínas pertenecen a una superfamilia que contiene motivos repetidos de pentapéptidos conservados, con la secuencia consenso: [S, T, A o V] [D o N] [L o F] [S, T o R] [G], que determinan una estructura secundaria específica fundamental para su actividad.⁶⁷

Hasta la fecha (diciembre 2022), se identificaron 128 variantes de genes *qnr*, según la base de datos *Refseq*, que se usa actualmente como repositorio de estos genes. Estas variantes están agrupadas en 7 familias: *qnrA* (12), *qnrB* (85), *qnrC* (1), *qnrD* (3), *qnrS* (14), *qnrVC* (9), y más recientemente, *qnrE* (4), descrita por primera vez por nuestro grupo de investigación.³⁶

La diseminación de los genes *qnr* es alarmante, especialmente para los alelos *qnrB*, que ya se detectaron en los 5 continentes, y constituyen los genes de PMQRs más frecuentes e importantes en América Latina.⁶⁰

2. La enzima bifuncional **AAC(6′)-Ib-cr** (“cr” por *ciprofloxacin resistance*). En 2006 se descubrió un segundo grupo de PMQRs, que consiste en una variante de la enzima aminoglicósido acetiltransferasa AAC(6′)-Ib, que acetila a los aminoglicósidos kanamicina, tobramicina y amicacina. La variante AAC(6′)-Ib-cr, debido a la sustitución de 2 aminoácidos (W102R y D179Y), también es capaz de acetilar el N del grupo piperazina, inactivando a las fluoroquinolonas norfloxacin y ciprofloxacin, pero no a otras quinolonas que no tienen el grupo piperazina en su estructura, como ácido nalidíxico y levofloxacin.⁵⁷ Según la base de datos *Refseq*, se conocen hasta la fecha (diciembre 2022), 10 alelos del gen *aac(6′)-Ib-cr*. Es el PMQR más reportado en las especies Enterobacterales, y el segundo más reportado en Latinoamérica.⁶⁰
3. La bomba de eflujo **QepA** se describió por primera vez en 2007, y pertenece a la familia de 14-MFS (del inglés: *Major facilitator superfamily*), cuya actividad es dependiente de protones. Tiene un tamaño variable y está constituida por 14 segmentos transmembrana.

Su actividad aumenta con la hidrofiliidad de la molécula, siendo máxima para las quinolonas más hidrofílicas, como ciprofloxacina y norfloxacina, y nula para la más hidrofóbica, ácido nalidíxico, por lo que el perfil de sensibilidad a quinolonas que confiere es muy similar al de AAC(6')-Ib-cr.⁵⁷ Según la base de datos Refseq, hasta la fecha (diciembre 2022) se reportaron 10 alelos del gen *qepA*. Este gen es muy poco frecuente en Latinoamérica, y se reportó únicamente en Argentina, Bolivia, Brasil y México.^{57, 60, 68, 69}

4. La bomba de eflujo **OqxAB**. La mayoría de las bombas de eflujo están codificadas en cromosomas bacterianos. En 2003, se identificó por primera vez la bomba de eflujo OqxAB, codificada en un plásmido conjugativo (pOLA52), de una *E. coli* aislada de cerdos de Dinamarca, que confería sensibilidad reducida, o resistencia de bajo nivel, a ácido nalidíxico, fumequina, ciprofloxacina y norfloxacina. Sin embargo, OqxAB es una bomba de eflujo inespecífica para quinolonas, pudiendo conferir también sensibilidad reducida, o resistencia, a olaquinox (una droga utilizada como promotor de crecimiento en cerdos), trimetoprima, tigeciclina, nitrofurantoína y cloranfenicol, así como a cloruro de benzalconio (compuesto de amonio cuaternario utilizado como desinfectante) y dodecilsulfato de sodio (SDS).⁷⁰ OqxAB está compuesta por las proteínas OqxA y OqxB, que tienen homología con MexE y MexF, o AcrA y AcrB, respectivamente, que son los componentes de las bombas de eflujo MexEF y AcrAB, pertenecientes a la familia RND. Las bombas de eflujo de esta familia son sistemas de tres componentes, como AcrAB-TolC, en la cual el tercer componente, TolC, es una proteína de membrana externa. Por lo tanto, OqxAB es una bomba de eflujo de la familia RND, y precisamente, se observó que el plásmido pOLA52, que solo contiene los genes *oqxA* y *oqxB*, depende de TolC, codificada en el cromosoma de la bacteria hospedadora, para conferir alto nivel de resistencia a olaquinox. Los genes *oqxA* y *oqxB* no sólo se encuentran en plásmidos, también es común encontrarlos en el cromosoma de diferentes especies de *Klebsiella*, sobre todo, *K. pneumoniae*.⁵⁹ Sin embargo, la presencia de *oqxA* y *oqxB* en el cromosoma de *Klebsiella spp.* no pudo correlacionarse con sensibilidad reducida, o resistencia a quinolonas, debido a múltiples factores involucrados en la regulación de la expresión de estos genes. En cambio, cuando *oqxA* y *oqxB* se localizan en plásmidos, en los cuales no se encuentran dichos factores reguladores, sus niveles de expresión son mayores⁵⁷. Ver sección 1.11 - (d) para información más específica sobre este tema.

5. La proteína **CrpP**. En 2018, mientras se estaba realizando la etapa experimental de esta tesis, se reportó en México un nuevo PMQR, constituido por la enzima CrpP, de 65 aminoácidos, que inactiva ciprofloxacina mediante fosforilación. El gen codificante de este mecanismo, *crpP*, se describió primero en un plásmido obtenido de *P. aeruginosa*, y

luego se reportó en diversas Enterobacterales, asociado a diferentes EGMs. Sin embargo, su ocurrencia es altamente inusual y de baja prevalencia.^{71, 72}

(b) Eficacia terapéutica y relevancia clínica de los PMQRs

Los PMQRs confieren *per se* bajos niveles de resistencia a las quinolonas, cuyas CIMs no superan los puntos de corte para resistencia establecidos por el CLSI o el EUCAST. Por ejemplo, en *E. coli*, los genes *qnr* producen valores de CIM para ciprofloxacina y levofloxacina muy similares a los que genera una sola mutación en *gyrA*, aunque confieren niveles más bajos de resistencia a ácido nalidíxico. Además, los genes *aac(6′)-Ib-cr* y *qepA* confieren solo sensibilidad reducida, o resistencia de bajo nivel a ciprofloxacina y norfloxacina. Se podría pensar entonces que los PMQRs tienen escasa relevancia clínica. Sin embargo, existe una serie de evidencias que pone de manifiesto la relevancia clínica de la presencia de PMQRs en aislamientos clínicos de Enterobacterales, y que se detalla a continuación.⁷³

En primer lugar, existe evidencia genética. La frecuencia de adquisición por conjugación de un gen de PMQRs ($\sim 10^{-5}$) es 100-1000 veces mayor que la frecuencia de aparición de una mutación en la QRDR de *gyrA* (10^{-7} a 10^{-8}).⁶⁷ Además, a esta “ventaja” en la adquisición de la primera etapa que puede llevar a resistencia neta (cabe recordar que para las quinolonas este proceso ocurre en etapas), se suma el incremento en la concentración preventiva de mutantes (CPM) que producen los genes de PMQRs. La CPM es la mínima concentración de antibiótico requerida para prevenir el crecimiento de mutantes resistentes, por lo cual, si la CPM es menor que la concentración de quinolonas alcanzada en el sitio de infección es improbable que emerja una mutante resistente. Se observó que la CPM de ciprofloxacina de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* portadores de *qnrA1*, o *aac(6′)-Ib-cr*, era 25 a 30 veces mayor que la CPM de los mismos aislamientos sin estos genes de PMQRs.^{73, 74} En estos casos, las CPMs fueron similares, o superiores, al pico de concentración de ciprofloxacina que se alcanza normalmente en el suero de un paciente, durante el tratamiento con esta droga. Por lo tanto, se propuso que la presencia de PMQRs proveía un escenario genético favorable para la selección de mecanismos de resistencia adicionales, como mutaciones en las QRDRs de *gyrA*, *gyrB* y *parC*.^{57, 73, 74} Y, en efecto, se comprobó que la presencia de *qnrA1* incrementaba más de 100 veces la frecuencia de selección de cepas mutantes, que contenían mutaciones QRDRs. Esta mutantes tenían un nivel de resistencia a fluoroquinolonas superior al conferido por un gen de PMQRs, o una mutación QRDR única, por separado, lo cual ilustra el efecto aditivo sobre la resistencia que tiene la combinación de ambos mecanismos.⁷⁵

El efecto “potenciador” de los genes de PMQRs en la adquisición de mutaciones en QRDRs se comprobó *in vivo* en un estudio longitudinal de nueve años, con enterobacterias aisladas en un hospital de Corea. A lo largo de dicho periodo, se observó un aumento significativo en la frecuencia de casos con mutaciones en *gyrA* y *parC* en los aislamientos que contenían genes de PMQRs: de 0% a 50%, entre los períodos 1998-1999 y 2005-2006, respectivamente, mientras que

esta frecuencia se mantuvo constante en aislamientos sin genes de PMQRs (46% y 50%, respectivamente)⁷⁶. Aún más, Poirel y col. reportaron falla de tratamiento con norfloxacin en una infección urinaria por *E. coli* productora de *qnrA1*, que no contenía mutaciones en QRDRs. A los 5 días de finalizado el tratamiento, la variante recuperada de la falla terapéutica tuvo 2 mutaciones en *gyrA*, y una en *parC*, con un consecuente aumento mayor de 64 veces en la CIM de ciprofloxacina.⁷⁷ Otros trabajos mostraron una asociación significativa entre la emergencia de genes de PMQRs y el nivel de no sensibilidad a ciprofloxacina de aislamientos de *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.* y *E. coli*, de un hospital de Jerusalén.^{78, 79} En un estudio prospectivo, con aislamientos de *Enterobacter spp.* y *K. pneumoniae* de bacteremias de un hospital de Corea, se observó que la presencia de genes *qnr* estaba significativamente asociada a la selección de resistencia múltiple, y a hospitalizaciones más largas (≥ 2 semanas), sin que se observara mayor mortalidad. Finalmente, también demostró falla en la respuesta microbiológica, utilizando un modelo de neumonía en ratones infectados con aislamientos de *K. pneumoniae*, con, o sin *qnrA1*, y tratados con ciprofloxacina, o levofloxacina. Luego del tratamiento con estas drogas, no se observó reducción en el conteo de bacterias viables en pulmón en las infecciones con *K. pneumoniae* con *qnrA1*. Además, la tasa de supervivencia de los animales infectados con *K. pneumoniae* con *qnrA1* fue el 53% de la correspondiente a las infecciones sin este gen, en concordancia con el resultado anterior.⁸⁰

Sección 1.11 Epidemiología molecular de los PMQRs y antecedentes en Argentina

La información existente en la bibliografía internacional muestra que los PMQRs se han diseminado principalmente mediante EGMs, incluyendo plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad y tamaños, transposones, islas genómicas e integrones, y generalmente se encuentran asociados a otros genes de RAM. Si bien la diversidad de EGMs a los que se asocian los genes de PMQRs es amplia, en varios de ellos los entornos son similares. En la mayoría de estos casos, esta situación se puede explicar por un origen cromosómico ancestral, que sufrió una serie de rearrreglos genéticos, incluyendo transposiciones, recombinaciones, deleciones e inserciones, que generaron las estructuras que se observan actualmente en los aislamientos secuenciados.⁵⁹ A continuación se describe brevemente lo que se conoce sobre la epidemiología molecular de los PMQRs descritos hasta el momento en el mundo y en la Argentina.

(a) Genes *qnr*

Varios de los alelos de las familias *qnrA* y *qnrB* se diseminaron mediante ICC1, dentro de la *vr-2*, incluyendo una duplicación de la misma, en esta tesis se denominaron integrones “twin” (Figura 26). Se propuso que los genes *qnrA* fueron secuestrados de un cromosoma ancestral del género *Shewanella*. En Latinoamérica, los genes *qnrA*, se reportaron principalmente en Brasil, México y Uruguay, aislados de muestras de diversos animales y humanos.⁵⁹ Particularmente en

Argentina, sólo se reportaron aislamientos de *E. coli* con *qnrA*, obtenidos de aves de consumo, si bien el tipo de alelo A y la plataforma de este gen no fue caracterizada.⁸¹

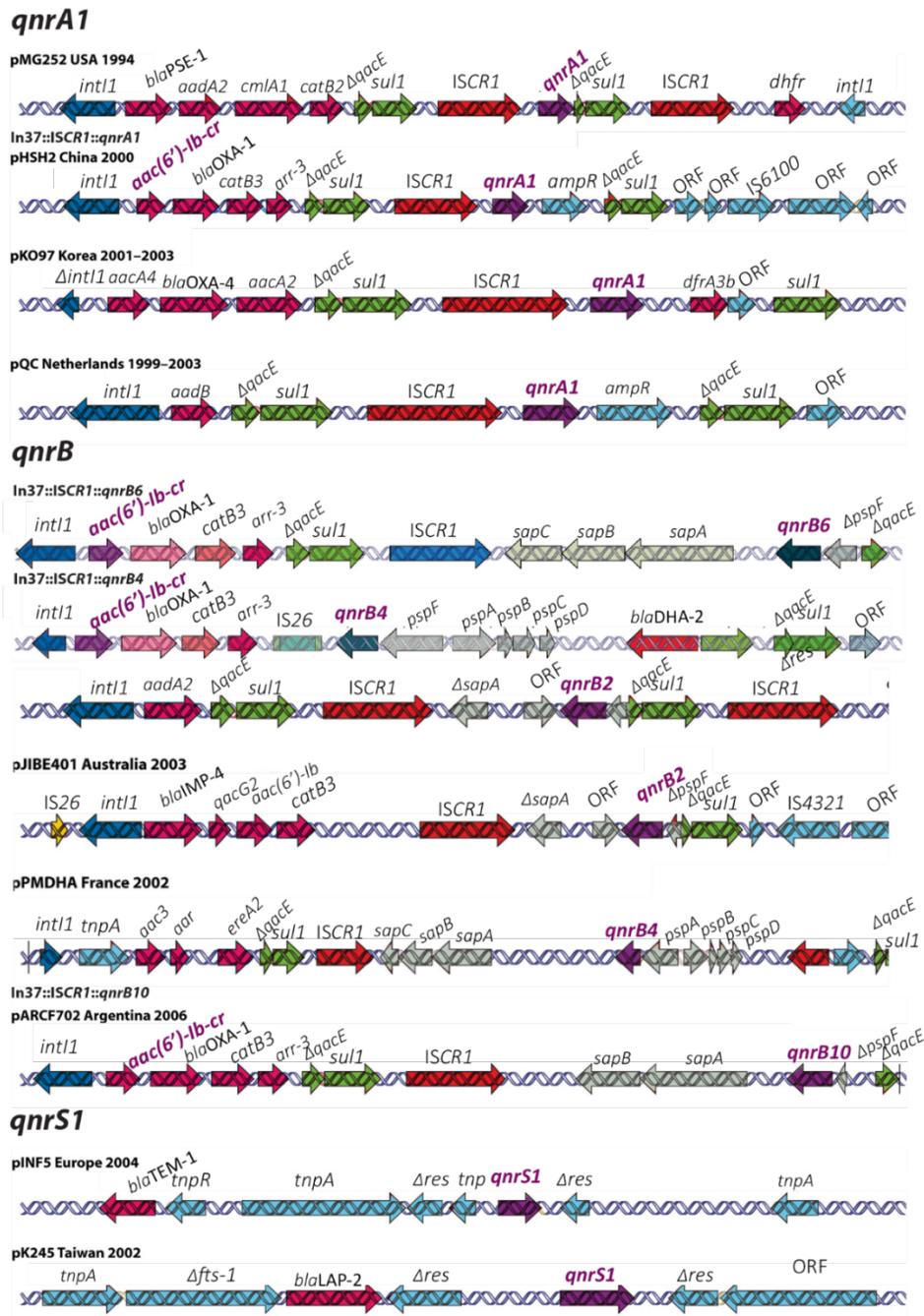


Figura 26. Entornos genéticos para diferentes genes de *qnr*. A la izquierda y arriba de cada estructura se indica el nombre del plásmido y del integrón (en los casos en que fueron asignados) además de la fecha y ubicación geográfica del aislamiento portador. Los genes se representan con flechas según su marco de lectura, y los colores se asignaron: en rosa genes de RAM, en violeta genes *qnr*, en gris los genes *sap* y *psp* que acompañan algunos *qnr*, en azul la integrasa (*int1*), en rojo *ISCR1*, en verde genes correspondientes a las regiones 3'CS, en amarillo *IS26*, y en celeste otros ORFs.

Con respecto a la familia *qnrB*, en la cual se describieron la mayor cantidad de alelos (85), se demostró que provienen del cromosoma de aislamientos del complejo *Citrobacter freundii*. Esto se pudo determinar debido a que los entornos genéticos de todos los alelos *qnrB* descritos son muy similares entre sí, y a sus homólogos encontrados en el cromosoma de *C. freundii*. Por ejemplo, en los ICC1 portadores de alelos *qnrB*, la *vr-2* contiene dos regiones muy conservadas que flanquean a dichos alelos. En primer lugar, río abajo de estos alelos *qnrB*, se localiza el operón *sapCBA*, (codifica para un sistema de transporte de péptidos). En segundo lugar, río arriba de los alelos *qnrB*, se localiza el operón de genes *psp* (codifica para proteínas asociadas a estrés por fagos; *phage shock protein*) (Figura 26). En un trabajo previo de nuestro grupo en colaboración con otros de Argentina, se describió por primera vez el alelo *qnrB10*, el cual se localizó en la *vr-2* de un ICC1, denominado In37::ISCR1::*qnrB10*. Este gen estaba flanqueado por las regiones conservadas mencionadas anteriormente: el operón *sapCBA*, y solo un fragmento 3' del gen *pspF*, del operón *psp*.^{47, 82} Al respecto, cabe aclarar que la extensión de las regiones *sap* y *psp* que flanquean diferentes alelos *qnrB* es muy variable, en concordancia con diferentes eventos de secuestro de dichos alelos, mediados por ISCR1. Esto constituye una evidencia más que sostiene el modelo propuesto por Toleman para explicar el origen de los ICC1 (ver Figura 15). Se debe notar que In37::ISCR1::*qnrB10* tiene una *vr-1* idéntica a las de In37::ISCR1::*qnrB4*, In37::ISCR1::*qnrB6* e In37::ISCR1::*qnrA1*, demostrando que los ICC1s pueden tener la misma *vr-1* pero distintas *vr-2* (Figura 26). A su vez, *qnrB10* también se encontró en Argentina en dos ICC1s que tenían la misma *vr-2* que In37::ISCR1::*qnrB10*, pero distintas *vr-1*⁸², al igual de lo que ocurre en las dos estructuras que contienen *qnrB2* indicadas en la Figura 26. Estos hechos demuestran la gran diversidad de combinaciones de genes de RAM que pueden tener ambas regiones variables.

En todos los aislamientos portadores de *qnrB10* identificados en otros estudios previos de nuestro grupo, este gen se localizó en ICC1s que tenían una *vr-2* idéntica a la de In37::ISCR1::*qnrB10*, pero no se caracterizaron las respectivas *vr-1*, ni sus entornos genéticos, ni sus plásmidos portadores.^{74, 83}

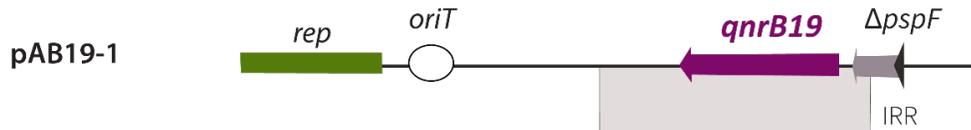
Otros alelos *qnrB* se localizan en plataformas distintas a los ICC1s. Para *qnrB19*, se describieron dos plataformas distintas, si bien, en ambas, las secuencias inmediatamente flanqueantes a este alelo están altamente conservadas con respecto a otros alelos *qnrB* (por ejemplo, la presencia de Δ *pspF*, río arriba de *qnrB19*). Estas dos plataformas se describen a continuación.

a) Plásmidos muy pequeños (aproximadamente 2,7-7 kb), de tipo ColE1 y similares entre sí, descritos en diversos países. Estos plásmidos son no conjugativos, pero sí movilizables y no contienen ningún otro gen de RAM, ni otros EGMs (Figura 27A).^{84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93}

En trabajos previos de nuestro grupo, se caracterizaron cuatro plásmidos tipo ColE1 que contenían *qnrB19*, y uno de ellos, denominado pPAB19-1 (2,699 kb), fue idéntico a los descritos en otros países.^{74, 83, 94} Estos plásmidos estuvieron casi ausentes en especies típicas de infecciones

hospitalarias, como *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *C. freundii* y *Serratia marscencens*, encontrándose casi exclusivamente en *E. coli* y *Salmonella spp.* (especies típicas de infecciones de la comunidad), por lo cual se los considera reservorios de *qnrB19*.^{74, 83} Estos plásmidos no se incluyeron en esta tesis porque fueron bien caracterizados previamente.

A Plásmidos del tipo ColE1



B Transposones derivados de ISEcp1

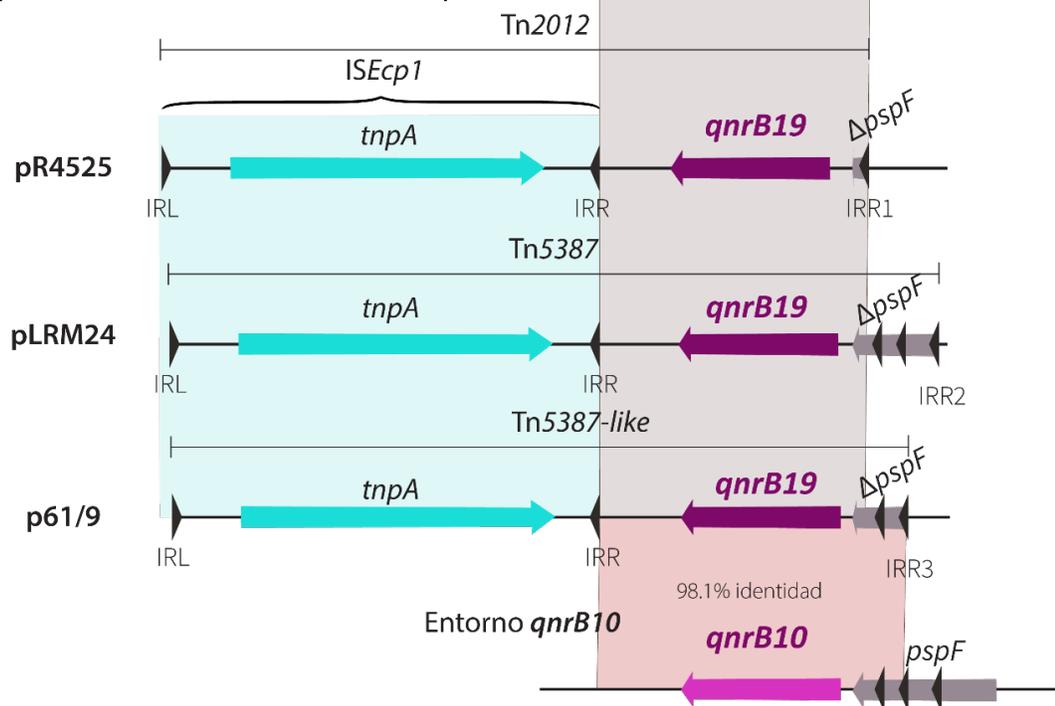


Figura 27. Entornos genéticos de *qnrB19*. Las líneas negras gruesas representan la secuencia de ADN. Los genes se representan con flechas y la dirección indica el marco de lectura, el color violeta identifica los genes *qnr*, el gris los genes *psp* y el celeste *tnpA*. Con forma de círculo blanco se representa el *oriT* y como un rectángulo verde la región *rep*. Las regiones con identidad entre las secuencias se resaltan con un sombreado gris para un 100% de identidad y rosa para un 98,1%. A) Entorno de *qnrB19* encontrado en los plásmidos del tipo colE1 (pPAB19, GQ412195). B) Entorno de *qnrB19* en transposones Tn2012, Tn5387 y Tn5387-like identificados en los plásmidos pR4525 (EU523120), pLRM24 (EU624315), y p61/9 (FJ790886). Estos transposones están compuestos por una ISEcp1 que capturó a *qnrB19* al utilizar un IRR alternativo (marcados en la figura como triángulos negros), razón por la que las deleciones en el gen *pspF* tienen diferentes longitudes en los tres casos detallados.⁹⁴

b) Transposones derivados de ISEcp1C, portadores de *qnrB19* (como Tn2012), que se describieron en Colombia (*E. coli*)⁹⁵, Estados Unidos (*K. pneumoniae*)⁹⁶ e Italia (*S. enterica*)⁹⁷, y

están localizados en plásmidos de 21 a 80 kb (Figura 27B). Estas estructuras fueron muy similares entre sí, y su análisis demostró la captura del alelo *qnrB19* por *ISEcp1C*.

Si bien en Argentina no se habían identificado estos transposones, una caracterización parcial realizada en uno de nuestros trabajos previos, sugirió que *qnrB19* estaba en un contexto similar.⁷⁴ Además, en otro estudio de nuestro grupo, se encontraron dos aislamientos portadores de *qnrB19*, cuyo análisis parcial sugirió la presencia de un entorno genético diferente a los a los dos mencionados aquí.⁸³

Otros alelos de *qnrB*, distintos a *qnrB19*, se encontraron también en plataformas diferentes a los ICC1, asociados a diversas ISs (en especial IS26), como *qnrB1*.⁶⁷

En cuanto a los genes de las familias *qnrC*, *qnrD*, *qnrE* y *qnrS* no suelen encontrarse asociados a ICC1s, sino más bien a ISs. El gen ***qnrC***, como ya se mencionó anteriormente, es poco frecuente a nivel mundial, aunque se encontró en varias Enterobacterales, incluyendo *E. coli* y los géneros *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella*, pero con muy pocos reportes hasta el momento. Este gen se encontró asociado a *ISpmi1* (familia IS3), y su origen probablemente sea el cromosoma de *Vibrio spp.*⁵⁹

La familia ***qnrD*** es otra de las que se encuentran poco frecuentemente, si bien hay mayor cantidad de reportes que para *qnrC*. El origen de estos genes aún se desconoce, y se localizan generalmente en plásmidos muy pequeños (menores a 10 kb), encontrados por lo general en aislamientos de la tribu *Proteeae*, que comprende los géneros *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*.⁵⁹ En Latinoamérica, hasta el momento sólo se reportaron en Argentina, Brasil y Uruguay.^{60,67 98}. En un trabajo previo de nuestro grupo, que constituyó el primer reporte de *qnrD1* en las Américas, se describieron dos aislamientos de *Proteus spp.*, que portaban este gen en plásmidos pequeños, de aproximadamente 2,4 kb, sin otros genes de RAM, ni asociados a EGMs.^{74, 99} Estos plásmidos fueron bien caracterizados previamente, por lo cual no se incluyeron en esta tesis.

Nuestro grupo de trabajo describió por primera vez, el primer miembro de la familia ***qnrE***.³⁶ En este mismo trabajo, se propuso que *qnrE1* fue movilizado por *ISEcp1* desde el cromosoma de *Enterobacter spp.* (considerado el origen de la familia *qnrE*), a un plásmido de un aislamiento clínico de *K. pneumoniae*, denominado pKp1130 (aproximadamente 185 kb), que fue caracterizado parcialmente.³⁶ Posteriormente, se hicieron varios reportes de este gen en Brasil, en muestras de origen humano y animal, y en todos ellos, *qnrE1* también estaba asociado a *ISEcp1*, y localizado en plásmidos del grupo M1.^{100, 101} En Uruguay también se identificaron varios aislamientos con *qnrE1*, sólo en muestras de origen animal, aunque sus plataformas genéticas no se caracterizaron.¹⁰² También se reportaron genes *qnrE* en otras partes del mundo, como en China, donde, además, se identificaron nuevos alelos de esta familia, todos en *Enterobacter spp.*, y movilizados también por *ISEcp1*.¹⁰³

Los genes de la familia *qnrS*, se asocian a ISs, como IS2, IS26, e ISEc1, y a transposones unitarios, como Tn3 (Figura 26).⁵⁹ En Latinoamérica se encuentran diseminados en varios países incluyendo Argentina, Brasil, México y Perú, tanto en muestras de animales como de humanos.⁶⁰

(b) *aac(6′)-Ib-cr*

En cuanto al gen *aac(6′)-Ib-cr*, se encontró en 3 entornos genéticos distintos:

(a) como primer casete de IC1 o ICC1, por ejemplo, en In37::ISCR1::*qnrB10* o In37::ISCR1::*qnrA1*, ya mencionados⁸²

(b) en el transposón Tn6238, en el cual *aac(6′)-Ib-cr* también se encuentra en forma de casete. Este transposón se describió por primera vez en Argentina, y se propuso que surgió del Tn1331, mediante la adquisición de las dos mutaciones en el gen *aac(6′)-Ib*, que lo transforman en *aac(6′)-Ib-cr*.¹⁰⁴ (Figura 28)

(c) asociado a IS26 y *bla*_{OXA-1}.^{74, 105, 106}

El gen *aac(6′)-Ib-cr* está ampliamente diseminado en Latinoamérica y el mundo.^{60 59, 67}

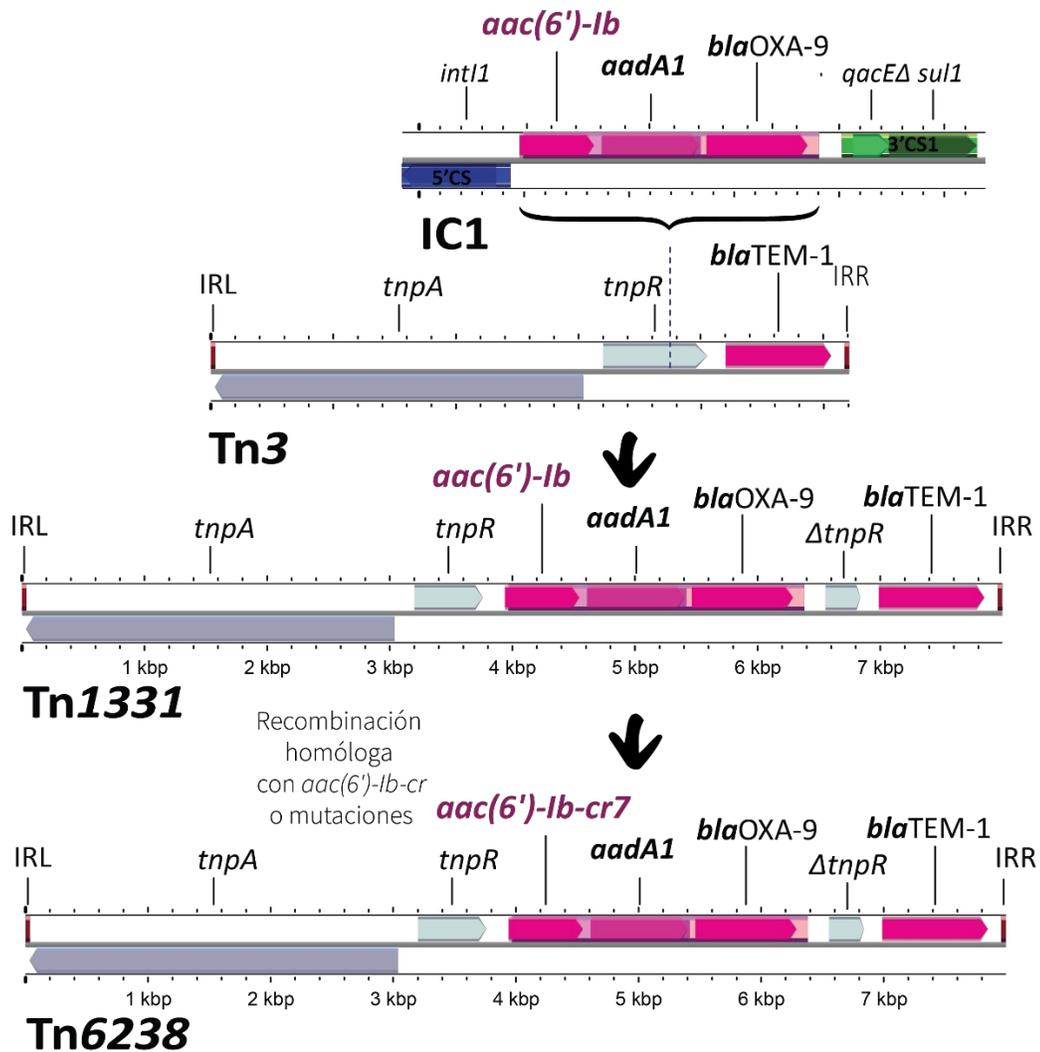


Figura 28. Esquema evolutivo de Tn6238. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se indican con color fucsia. Un *Tn3* habría incorporado los genes de resistencia *aac(6')-Ib*, *aadA1*, *blaOXA-9* duplicando una región del *tnpR* e interrumpiéndolo, formando lo que se denomina *Tn1331*. Este transposón habría sufrido recombinação homóloga o adquirido mutaciones en el gen *aac(6')-Ib*, dando lugar al *Tn6238*, que consiste en la misma composición del *Tn1331*, pero con *aac(6')-Ib-cr7* en lugar de dicho gen. Adaptado de Quiroga y col. ¹⁰⁴

(c) *qepA*

Los genes *qepA* también se encuentran asociados a diferentes ISs, como IS26, e ISCR3C, o bien, formando parte de un integrón de una estructura genética inusual. Si bien el reservorio natural de estos genes sigue siendo desconocido, la secuencia de aminoácidos de la proteína QepA comparte identidad con proteínas de membrana de actinobacterias pertenecientes al orden Actinomycetales. ⁶³ Estos PMQRs no son muy frecuentes, en especial en Latinoamérica, donde sólo hubo pocos reportes de Argentina, Bolivia y México. ⁶⁰

(d) *oqxAB*

El operón ***oqxAB*** es ubicuo en algunas Enterobacteriales: se encontró en casi todos los cromosomas de aislamientos de *K. pneumoniae* y *Raoultella spp.*, y en varios de *K. oxytoca*. Como ya se mencionó en sección 1.11 - (d), cuando *oqxAB* se localiza en el cromosoma, está asociado a dos genes: *rarA* y *oqxR*, que son reguladores del operón positivo y negativo, respectivamente. Sin embargo, se observó que en la mayoría de los casos los genes *oqxAB* no se expresan por lo que no confieren resistencia. Por lo tanto, no se consideró pertinente en esta tesis realizar un análisis de los genes *oqxAB* en *Klebsiella spp.*, ya que se consideraron de localización cromosómica, y no tienen impacto de relevancia clínica sobre la resistencia a quinolonas.

Los genes *oqxAB* también se describieron en plásmidos, donde estaban flanqueados por IS26. Los genes *oqxAB* plasmídicos mostraron alto porcentaje de similitud con sus homólogos cromosómicos. Estos hallazgos sugieren que estos genes fueron movilizados por IS26 desde su localización cromosómica original.¹⁰⁷ El primer plásmido conteniendo *oqxAB*, denominado pOLA52, se identificó en una *E. coli* aislada de cerdos. En pOLA52, *oqxAB* estaba flanqueado por IS26 formando un transposón denominado Tn6010, de 6.731 pb (Figura 29).¹⁰⁸ Flanqueando uno de los extremos del Tn6010, se localizó el gen *bleO* (resistencia a bleomicina), y río arriba del mismo se observó un Tn3 interrumpido por IS26. Flanqueando el otro extremo del Tn6010, se encontró un transposón compuesto de IS1 (5,6 kb), denominado Tn6011 (Figura 29). Los genes *mrkABCD* que portaba Tn6011, incrementan la eficiencia de la conjugación y la formación de biofilm en algunas enterobacterias. Ambos transposones (Tn6010 y Tn6011) también se encontraron en el cromosoma de *K. pneumoniae* con alta identidad, por lo que se estima que ambos provienen de un mismo origen.¹⁰⁷ En un plásmido de *Salmonella*, se encontró la misma estructura de 10 kb, Δ Tn3-IS26-*bleO*-Tn6010 (Figura 29), descrita en pOLA52, por lo cual se propuso que esta estructura podría movilizarse como una sola unidad.

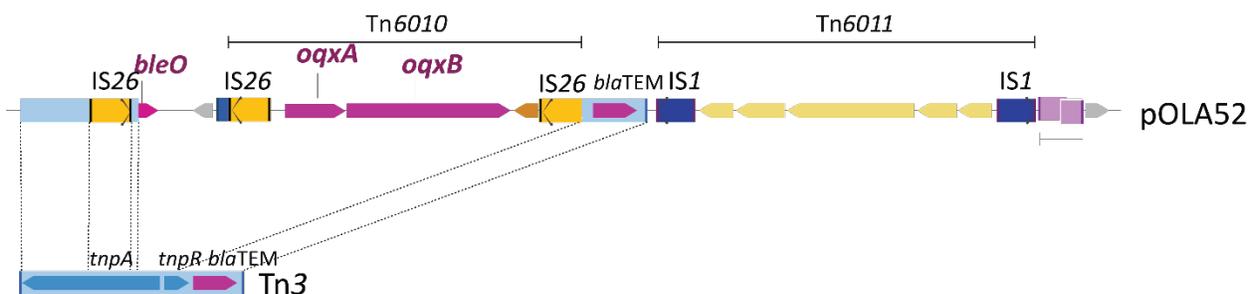


Figura 29. Entorno genético *oqxAB* en pOLA52. Los genes se representan con flechas indicando el sentido del ORF. Los genes de RAM se identifican en color magenta y las IS26 en amarillo. Los genes *oqxAB* se identificaron dentro del Tn6010 el cual está flanqueado por secuencias que tienen identidad con el Tn3. Además, al lado del Tn6010 se identificó el Tn6011. Figura adaptada de Norman y col.¹⁰⁸

El operón *oqxAB*, se encontró en plásmidos transferibles pertenecientes a distintos grupos, como F, I, HI, y X. Este gen está más reportado en muestras obtenidas de animales que de humanos, y sólo se reportó con muy bajas frecuencias en Argentina, Brasil y Colombia.⁶⁰

Nuestro grupo de trabajo describió la presencia de los genes *oqxAB* en un aislamiento clínico de *E. coli*, pero no se analizó si estaban asociados a algún EGMs, ni se caracterizaron sus entornos genéticos. Hasta donde sabemos, este trabajo constituye el único reporte en Argentina de *oqxAB*, en Enterobacteriales diferentes de *Klebsiella spp.*¹⁰⁹

Sección 1.12 Antecedentes y relevancia del tema de estudio de esta tesis

En el marco del proyecto de investigación de caracterización de PMQRs de nuestro laboratorio y en estudios previos a esta tesis, se analizaron 2 colecciones, con un total de 1163 aislamientos de Enterobacteriales de 74 hospitales de todo el país. El objetivo de este análisis consistió en identificar los PMQRs circulantes en Argentina y estimar su prevalencia. Se identificaron diversos genes de PMQRs, como *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB10*, *qnrB19*, *qnrD1*, *qnrS1*, *qnrE1* y *aac(6′)-Ib-cr*, pero solo se caracterizaron los plásmidos menores a 3 kb (plásmidos tipo ColE1, portadores de *qnrB19*, y los portadores de *qnrD1*) y dos plataformas genéticas contenidas en plásmidos de mayor tamaño, que contenían *qnrB10* y *qnrE1*.^{74, 82, 83, 94, 99, 109} Además, se identificaron 45 aislamientos que tenían un fenotipo de sensibilidad a quinolonas compatible con la presencia de PMQRs, pero en los cuales no se pudo detectar, mediante PCR, ninguno de los genes de PMQRs conocidos hasta ese momento.

En segundo término, si bien en la bibliografía internacional existían estudios de caracterización de plásmidos portadores de PMQRs, hasta nuestro conocimiento nunca se había realizado un análisis sistemático de una colección de plásmidos portadores de PMQRs, circulantes en diversos hospitales de una misma región geográfica. Además, es común que los plásmidos portadores de PMQRs contengan varios genes de resistencia a otros antimicrobianos, lo cual conlleva a la coselección de genes de RAM y, por lo tanto, a multirresistencia. La caracterización molecular completa de plásmidos portadores permitiría identificar los replicones asociados a distintos PMQRs y a otros genes de RAM circulantes en nuestro país, y además determinar el rol que juegan en la diseminación de los PMQRs varios EGMs muy relevantes en la diseminación de genes de RAM, como *IS26*, *ISEcp1*, *Tn3* y sus derivados, etc. Este trabajo también tiene como producto de suma importancia la obtención de una colección de secuencias completa de plásmidos de Enterobacteriales portadores de genes de PMQRs circulantes en los hospitales de nuestro país, lo cual podrá servir para abrir futuras líneas de investigación sobre la relevante temática de la RAM.

Por lo tanto, este trabajo también tiene impacto clínico y epidemiológico dada la importancia del estudio y caracterización de las plataformas moleculares de los genes de RAM.

Objetivos

"La ciencia es el arte de crear preguntas más que de dar respuestas."

- Claude Lévi

2 Objetivos

Objetivo General I:

Identificar y caracterizar nuevos PMQRs en aislamientos clínicos de enterobacterias del país.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar nuevos PMQRs en un conjunto de enterobacterias clínicas que presentan perfiles de sensibilidad a quinolonas compatibles con la presencia de esos mecanismos, pero en las que no se detectó ningún PMQR ya descrito.
- 2) Caracterizar los genes codificantes para los nuevos PMQRs identificados.
- 3) Implementar un sistema de detección molecular para los nuevos PMQRs caracterizados.

Objetivo General II:

Analizar los plásmidos portadores de los genes de PMQRs identificados en Argentina.

Objetivos específicos:

- 1) Obtener una colección de plásmidos (*plasmoteca*) portadores de genes codificantes para PMQRs.
- 2) Realizar un análisis completo a nivel molecular de los plásmidos obtenidos.

Materiales y métodos

*"La investigación científica debe estar orientada
hacia la solución de los problemas del hombre y de la sociedad".*

- Manuel Sadosky

3 Materiales y métodos

Sección 3.01 Aislamientos clínicos de enterobacterias

A fin de identificar los genes PMQRs circulantes en Argentina, y estimar su prevalencia a nivel nacional, en dos proyectos previos de nuestro laboratorio se habían estudiado dos colecciones de enterobacterias clínicas.^{74, 82, 83, 94, 99, 109} En el primero de estos proyectos, se utilizó la Colección A compuesta por 105 aislamientos de enterobacterias con fenotipos inusuales de sensibilidad a quinolonas, enviados a nuestro laboratorio (Laboratorio Nacional de Referencia en resistencia a los antimicrobianos) durante el período 2005-2008, por 31 laboratorios clínicos (CABA y 11 Provincias). Estos fenotipos inusuales sugerían la presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas de bajo nivel y, por lo tanto, difíciles de jerarquizar como *sensibles* o *resistentes* en las pruebas de sensibilidad de rutina realizadas en esos laboratorios.⁸³ En el segundo proyecto, se utilizó la Colección B, compuesta por 1.058 aislamientos de enterobacterias recolectados consecutivamente durante un periodo de cinco días (abril 2007), en 66 hospitales de la Red WHONET-Argentina¹ (CABA y las 23 Provincias). A diferencia de la anterior, esta colección era apropiada para estimar prevalencia de PMQRs, por incluir aislamientos no seleccionados.

En la Colección A, el 57% (60/105) de los aislamientos tuvieron genes de PMQRs, lo cual era esperable, dado el sesgo de esta colección hacia la presencia de esos genes⁷⁴. En la Colección B, la prevalencia de PMQRs fue muy variable de acuerdo a la especie: 63% en *C. freundii* (concorda con el rol de reservorio de genes *qnrB* propuesto para esta especie); 22% en *Klebsiella* spp.; 13% en *Enterobacter* spp.; 11% en *Salmonella* spp.; 5,9% en *E. coli* y 3,1% en *Proteus* spp. No se encontraron PMQRs en *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Providencia stuartii* y *Morganella morganii*.⁸²

En los 119 aislamientos de ambas colecciones: *C. freundii* (5), *E. asburiae* (2), *E. cloacae* (12), *E. coli* (24), *K. oxytoca* (4), *K. pneumoniae* (52), *M. morganii* (1), *P. mirabilis* (1), *P. vulgaris* (1), *Salmonella* (15) y *S. marcescens* (2); se realizó la búsqueda de los PMQRs descritos hasta ese momento. Los genes encontrados fueron: *qnrB1* + *aac(6′)-Ib-cr*; *qnrB2* y *qnrB10*, ambos sin, y con *aac(6′)-Ib-cr*; *qnrB6*; *qnrB9*; *qnrB19*; *qnrB28*; *qnrD1*; *qnrS1*, sin, y con, *aac(6′)-Ib-cr*; *aac(6′)-Ib-cr* (sólo) y *oqxA/oqxB* (sólo, o combinado con otros genes PMQRs,). Los alelos *qnrB6*, *qnrB9* y *qnrB28* solo se identificaron en cuatro *C. freundii* (1, 2 y 1 aislamientos, respectivamente), pero

¹ En 1989, el Servicio Antimicrobianos implementó la *Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, WHONET-Argentina*, constituida actualmente por 89 centros de referencia, o Referentes Jurisdiccionales (laboratorios de microbiología de centros de salud públicos y privados), y sus laboratorios periféricos (su funcionamiento en la Red se articula con los correspondientes Referentes Jurisdiccionales).

se localizaron en el cromosoma, por lo que no se tuvieron en cuenta para el desarrollo de esta tesis. Los genes *qnrA*, *qnrC* y *qepA* no fueron encontrados en ninguna de las colecciones.

Durante el desarrollo de esta tesis (entre marzo de 2014 y abril de 2017), fueron derivados 5 aislamientos clínicos al LNR que formaron parte de otros proyectos de investigación. Se incluyeron a la plasmoteca ya que se contenía acceso a las secuencias y se consideraron pertinentes para ampliar el conocimiento de los PMQRs y sus plataformas. Estos aislamientos son:

- 1) *K. quasipneumoniae* M17277, contenía *qnrB4* y *qnrB52*, ninguno de ellos reportados previamente en Argentina, además el único aislamiento con dos *qnrB*, es decir tres PMQRs en total (*qnrB4*, *qnrB52* y *aac(6')-Ib-cr5*).
- 2) *K. pneumoniae* M21692, portador de *qnrE1*.
- 3) *E. cloacae* M17464 único aislamiento encontrado portador de *qnrA1*.
- 4) *K. pneumoniae* M22246 portador de *qnrB1*.
- 5) *P. stuartii* M21014 portador de *qnrB1*.

Los aislamientos se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales: Agar TSI (triple azúcar hierro), agar LIA (lisina, hierro, agar), agar CITRATO, medio SIM (sulfuro, indol, movilidad) y MIO (movilidad, indol y ornitina).

Sección 3.02 Sensibilidad a los antimicrobianos

Se determinó la sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión con discos (antibiograma) siguiendo la metodología establecida por el CLSI.¹¹⁰ Brevemente, en esta técnica se inoculó la superficie de una placa de agar Mueller Hinton con un hisopo previamente embebido en una suspensión de la bacteria a analizar, ajustada a una turbidez 0,5 en la escala McFarland. Sobre esta placa inoculada se colocaron los discos comerciales de los antibióticos a ensayar, y se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 16-18 hs. Se utilizaron los siguientes antibióticos: ampicilina, cefotaxima, cefepime, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, imipinem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, pefloxacina, levofloxacina, amikacina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprima- sulfametoxazol, y tetraciclina. Se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI.¹¹⁰

La detección fenotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) se realizó evaluando la sinergia producida entre cefotaxima y/o ceftazidima con ácido clavulánico.¹¹⁰

Sección 3.03 Conjugaciones biparentales

Se realizaron ensayos de conjugación biparental de acuerdo a un método descrito previamente¹¹¹, utilizando *E. coli* J53 resistente a azida sódica (Az-R) como cepa aceptora. El fenotipo Az-R es comúnmente utilizado por los distintos grupos que trabajan con PMQRs, ya que permite la selección de transconjugantes de la cepa aceptora sin utilizar antibióticos de uso clínico y, de esta forma, se puede analizar la transferencia de genes que confieren resistencia a los mismos. Se seleccionaron las transconjugantes sembrando 100 µl de cada dilución en placas de TSA con 0,03 µg/ml de ciprofloxacina y 200 µg/ml de azida para la selección de transconjugantes. Se dejaron crecer todas las placas de selección y de controles 18hs a 35°C. Todos los ensayos de conjugación se realizaron incubando la mezcla de cultivos del aislamiento clínico dador y la cepa aceptora a la temperatura mencionada, excepto en casos especiales indicados en Resultados, en los que se realizó a 25°C. Las transconjugantes se identificaron mediante pruebas bioquímicas y se comprobó la transferencia del fenotipo de resistencia analizado mediante antibiograma. Además, en los casos en los que se conocía el/los genes/es a transferir, se realizó una PCR con cebadores específicos para confirmar su presencia. Cuando se conjugaron aislamientos clínicos de *E. coli* como dadores, la presencia de transconjugantes derivadas de *E. coli* J53 Az-R se confirmó mediante la prueba bioquímica adicional de ornitina (detección de la enzima ornitina decarboxilasa) ya que el aislamiento *E. coli* J53 (ornitina negativa) tiene un fenotipo atípico para esta especie bacteriana. Para el aislamiento M17277, fue necesario hacer la incubación a temperatura ambiente (25°C) para permitir la conjugación de un plásmido del grupo de incompatibilidad HI.³¹

Sección 3.04 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección genotípica de la resistencia se realizó por el método molecular PCR utilizando cebadores (*primers*) que se detallan en la tabla 3. Para llevar a cabo la PCR, la extracción de ADN se realizó mediante el método de “*boiling*”. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2,5 µl de ADN molde, 0,3 µl (1 U) de Taq polimerasa (Invitrogen CA, USA), 2,5 µl (1x) de buffer 10x, 0,75 µl (1,5 mM) de cloruro de magnesio, 0,5 µl (0,2 µM) de cada uno de los cebadores, 0,5 µl (0,2 mM de cada uno) de los dNTPs, en un volumen final de 25 µl. Como controles positivos se utilizaron muestras conteniendo los genes de interés, caracterizadas previamente en el laboratorio, y como control de extracción se amplificó el gen que codifica para el ARNr del 16S en todos los aislamientos. El programa de ciclado de temperaturas para la PCR dirigida contra cada gen consistió en:

- a) Desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos.

b) Treinta ciclos, con las siguientes etapas: 30 segundos de desnaturalización, a 94°C; 30 segundos de pegado de primers o *annealing*, a la temperatura específica para el gen analizado (ver tabla 3 de cebadores); y 1 minuto de extensión a 72°C.

c) Extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Una alícuota de 5 µl de cada producto de amplificación se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X (Tris-borato 4,45mM; EDTA 1mM pH 8,3), con 10 mg/ml de bromuro de etidio, realizando la corrida a 120 V, durante 60 min. Las bandas de ADN se visualizaron y guardaron mediante el registrador de imágenes Molecular Image Gel DOC XR (BioRad).

Tabla 4. Cebadores utilizados para las PCRs ensayadas en esta tesis.

Gen	Amplión	Nombre del primer	Secuencia	Temperatura de Annealing (°C)
<i>qnrA</i>	680	<i>qnrNEW-F</i>	5'-CCCTGATTAAGGAAGCCGT-3'	52
		<i>qnrNEW-R</i>	5'-GAGCTAATCCGGCAGCACTAT-3'	
<i>qnrB</i>	524	<i>qnrB-F</i>	5'-CCGACCTGAGCGGCACTGA-3'	55
		<i>qnrB-R</i>	5'-CGCTCCATGAGCAACGATGCCT-3'	
<i>qnrS</i>	417	<i>qnrS-F</i>	5'-ACGACATTCGTCAACTGCAA-3'	55
		<i>qnrS-R</i>	5'-TAAATTGGCACCCCTGTAGGC-3'	
<i>aacCR</i>	277	<i>aac-cr-F</i>	5'-GCTCTTGGGAAGCGGGGACGAAA-3'	55
		<i>aac-cr-R</i>	5'-GAACCATGTACACGGCTGGACGTA-3'	
<i>repHI1</i>	471	<i>HI1-FW</i>	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	54
		<i>HI1-RV</i>	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'	
<i>repHI2</i>	647	<i>HI2-FW</i>	5'-TTTCTCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	60
		<i>HI2-RV</i>	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	
<i>ORF513</i> <i>qnrB</i>	3.482*	<i>InsB6-R</i>	5'-GAAGCGTGTGAGGTTG-3'	48
		<i>qnrB_out5</i>	5'-ACAGAAACCGCTTCACC-3'	

Sección 3.05 Secuenciación por Sanger

Las reacciones de secuenciación de ADN por Sanger se realizaron por el método de los terminadores de cadena de Sanger, utilizando el equipo comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, y secuenciadores automáticos *3500 Genetic Analyzer* (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"). El ADN molde para las reacciones de secuenciación por Sanger se obtuvieron por PCR. Se utilizaron los mismos cebadores empleados para la amplificación por PCR. Las secuencias de ADN obtenidas se visualizaron y analizaron con el software *Chromas* (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>).

Sección 3.06 Endonucleasa S1 y perfil plasmídico

Para realizar la caracterización del perfil plasmídico, se aplicó la técnica de nucleasa S1, que consiste en linealizar las moléculas circulares de los plásmidos mediante un corte único. Las moléculas linealizadas se separan mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), estimando su tamaño con estándares de peso molecular conocido. Este procedimiento se realizó de la siguiente forma. A partir de un cultivo fresco de 16 hs. de la bacteria a ensayar, se aislaron las células por centrifugación a 13.000 R.P.M., y se resuspendieron en 0,5 ml de Buffer de Suspensión de Células (BSC, 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8), hasta una densidad óptica (DO) de 5 unidades a 620 nm. Esta suspensión se incubó 10 minutos a 42°C, y luego se mezcló con un volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% en buffer PIV (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8), precalentado a 42°C. Mediante una micropipeta, se depositaron alícuotas de 20 µl de esta mezcla en una placa de vidrio, que luego se cubrió con un portaobjetos para aplastar las gotas de la mezcla y obtener discos de agarosa, denominados “plugs”, que contienen las células bacterianas intactas. Los plugs se sometieron a -20°C durante 5 minutos, y luego a temperatura ambiente, durante 10 minutos, para obtener una óptima gelificación. Seguidamente, los plugs se incubaron a 50°C, durante 17 horas, en 1 ml de Buffer de Lisis (BLC, 1% Sarcosyl, en 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8), conteniendo 1 mg de proteinasa K. A continuación, los plugs se lavaron con agitación cinco veces durante 30 minutos con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), a temperatura ambiente y luego se almacenaron a 4°C en buffer TE. Para realizar la restricción con endonucleasa S1, los plugs se equilibraron en buffer S1 (50 mM acetato de sodio, 2,8 mM NaCl, 45 mM ZnSO₄, pH 4,5), a 37°C durante 30 minutos, y luego se agregaron 0,5 unidades de endonucleasa S1 (Promega) por plug, en un volumen final de reacción de 100 µl, continuando la incubación a 37°C, durante 45 minutos. Los plugs se sembraron en un gel de agarosa calidad PFGE (BioRAD) al 1% en buffer TBE 0,5X, junto con el genoma de *Salmonella* Braenderup digerido con la enzima de restricción XbaI, que se utilizó como marcador de peso molecular. Para el PFGE se utilizó un equipo CHEF DR-III (BioRAD), con las siguientes condiciones: 200 V (6 V/cm), 14°C con un tiempo inicial de pulsado de 5 segundos, final de 35 segundos y 20 horas de corrida. Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas de ADN. El análisis del gel y la estimación del tamaño de las bandas observadas en el gel se realizó mediante el software *Image Lab*, versión 6.1 (BioRad), utilizando los tamaños ya conocidos de los fragmentos del genoma de *Salmonella* Braenderup.

Sección 3.07 Extracción y Secuenciación Masiva (NGS) de ADN

El flujo de trabajo que se utilizó para el análisis bioinformático de los plásmidos portadores de PMQRs se explica en detalle en las próximas secciones y se resume en la Figura 30.

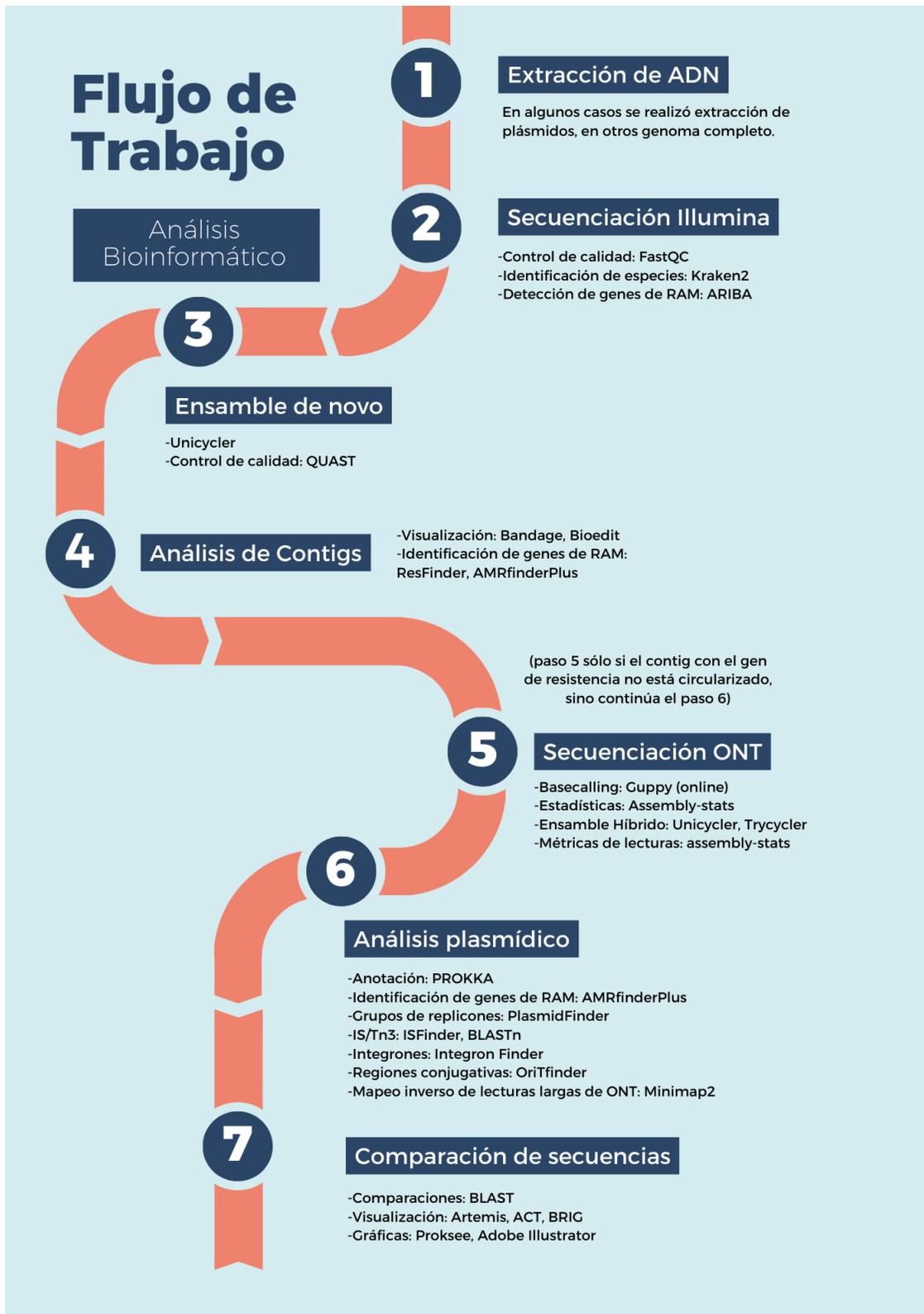


Figura 30. Flujo de trabajo utilizado para el análisis bioinformático de los plásmidos portadores de PMQRs.

(a) Secuenciación por Illumina

La secuenciación por Illumina se utilizó el equipo Illumina de Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

El ADN plasmídico se extrajo mediante el *Large-Construct Kit* (QIAGEN) para su posterior secuenciación completa mediante técnicas de nueva generación (NGS, por las siglas del inglés *Next Generation Sequencing*). La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante el sistema comercial *Qubit dsDNA BR Assay*, utilizando el fluorómetro *Qubit® 2.0* (Life Technologies).

La secuenciación de genoma completo se realizó usando la tecnología Illumina y un secuenciador MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, Estados Unidos). Para esto, las bibliotecas genómicas se construyeron mediante el sistema comercial Nextera® XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, este sistema consiste en la fragmentación del ADN en segmentos de aproximadamente 2.500 pb mediante el transposón Nextera XT (por lo cual este proceso se denomina tagmentación) y la marcación de los extremos con secuencias adaptadoras. Se amplificaron por PCR los fragmentos marcados y se removieron los restos de los productos obtenidos en la PCR, mediante el uso de AMPure XP beads. Se realizó la normalización de las bibliotecas para equilibrar la representatividad de cada una en la muestra combinada; luego se combinaron volúmenes iguales de las bibliotecas normalizadas diluidas en buffer de hibridación y desnaturalización; finalmente se realizó la generación de clusters y posterior secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq.

(b) Secuenciación por Oxford Nanopore Technologies (ONT)

Para obtener las secuenciaciones con la tecnología de ONT, se enviaron los aislamientos a secuenciar a los Laboratorios de Salud Pública de Ontario, institución en la cual trabaja el Dr. Melano, investigador colaborador de los proyectos en los que participa nuestro laboratorio.

La extracción de ADN para la secuenciación por la tecnología de ONT, se realizó mediante el sistema comercial *MasterPure Complete DNA & RNA Purification* (Epicenter Illumina, Wisconsin USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La secuenciación de lecturas largas se desarrolló mediante la tecnología de ONT. Las bibliotecas genómicas se prepararon utilizando 400 ng de cada genoma, mediante el sistema comercial *Rapid Barcoding SQK-RBK004* (ONT), que permite secuenciar hasta 12 genomas al mismo tiempo. En este sistema, las moléculas provenientes de cada genoma se marcan con un oligonucleótido, o índice, distinto, en un proceso denominado indexación o “multiplexado”. La secuenciación se realizó con una *flow cell FLO-MIN106D*, versión R9.4.1, utilizando un secuenciador *MinION*, durante 48 hs. La asignación de bases (*basecalling*), que transforma los archivos FAST5 de salida del secuenciador, a archivos Fastq, se realizó con Guppy, en forma en

línea (*online*). Mediante la herramienta Porcephop se procesaron las lecturas obtenidas para identificarlas y luego eliminar los adaptadores. ¹¹²

Sección 3.08 Análisis bioinformático

(a) Control de calidad de las lecturas de Illumina

El control de calidad de todas las secuencias obtenidas mediante la tecnología de Illumina se realizó utilizando la herramienta bioinformática FastQC (versión 0.11.5)¹¹³, que se ejecutó en entorno Windows. Esta herramienta analiza los dos archivos fastq obtenidos en la secuenciación y realiza diversos análisis de calidad. A continuación se describen brevemente los más importantes.

a) Como parte de las estadísticas básicas de secuenciación, FastQC calcula el porcentaje de guanina-citosina (%GC) de la secuencia obtenida. Cuando se secuenció ADN total bacteriano, se tuvo en cuenta que el %GC obtenido fuera acorde a lo esperado para la especie a la cual pertenecía el aislamiento, o la cepa secuenciada, por ejemplo, 50% para *E. coli* J53 Az-R.

b) Uno de los análisis más importantes para determinar la calidad del proceso, es la calidad de secuencia por base (*Per base sequence quality*), en el cual se determinó la distribución de los valores de un *score* de calidad, denominado Phred, para las bases localizadas en cada posición de un alineamiento de todas las lecturas obtenidas (Figura 31). El parámetro Phred (Q) es un número entero que representa la probabilidad de error estimada para una base en una lectura de ADN, es decir, la probabilidad de que esa base haya sido asignada incorrectamente. El *score* Phred se define como:

$$Q = -10 \log_{10} P$$

donde P es la probabilidad de error. Por ejemplo, si P=0,001 (1 error en 1.000), Q=30.

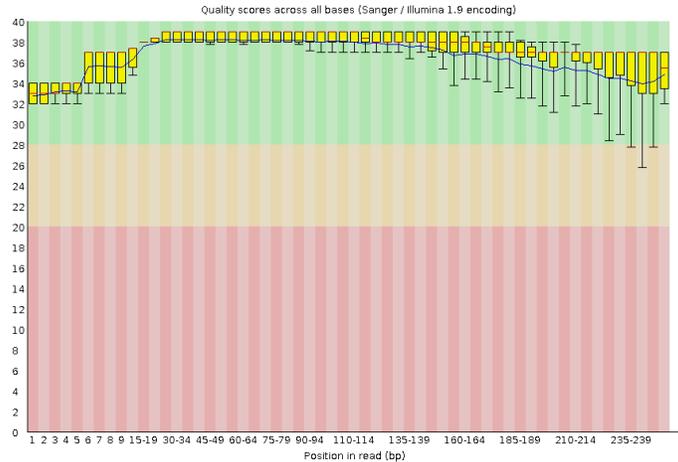


Figura 31. Control de calidad de las secuencias mediante FastQC. En el eje de las “X” la posición de las bases, y en el eje de las “Y” el puntaje en cuanto a la calidad. Para cada posición hay una caja amarilla que representa un análisis estadístico mediante un box plot en donde se ve representado: el valor de la mediana como una línea central roja que atraviesa la caja, el rango intercuartílico (25-75%) representado por la caja amarilla y con los bigotes extremos se representan el 10% y el 90% de los valores. La línea azul indica el promedio. Las zonas verde, naranja y roja representan rangos de calidad: muy buena ($Q \geq 28$), razonable ($28 > Q \geq 20$) y pobre ($Q < 20$), respectivamente.

En este trabajo de tesis se consideró que un ensayo de secuenciación por Illumina tenía un nivel de calidad aceptable cuando las cajas amarillas indicadas en la Figura 31. Control de calidad de las secuencias mediante FastQC. En el eje de las “X” la posición de las bases, y en el eje de las “Y” el puntaje en cuanto a la calidad. Para cada posición hay una caja amarilla que representa un análisis estadístico mediante un box plot en donde se ve representado: el valor de la mediana como una línea central roja que atraviesa la caja, el rango intercuartílico (25-75%) representado por la caja amarilla y con los bigotes extremos se representan el 10% y el 90% de los valores. La línea azul indica el promedio. Las zonas verde, naranja y roja representan rangos de calidad: muy buena ($Q \geq 28$), razonable ($28 > Q \geq 20$) y pobre ($Q < 20$), respectivamente., se localizaron solo en la zona verde, es decir, cuando al menos el 75% de las bases de cada una de las lecturas del ensayo tenían valores de $Q \geq 28$. En caso contrario se procedió a repetir la secuenciación.

c) Otro análisis de FastQC es la Composición de la secuencia por base (*Per base sequence content*), en el cual se calculó el porcentaje de cada uno de los cuatro nucleótidos en cada posición de todas las lecturas obtenidas (Figura 32).

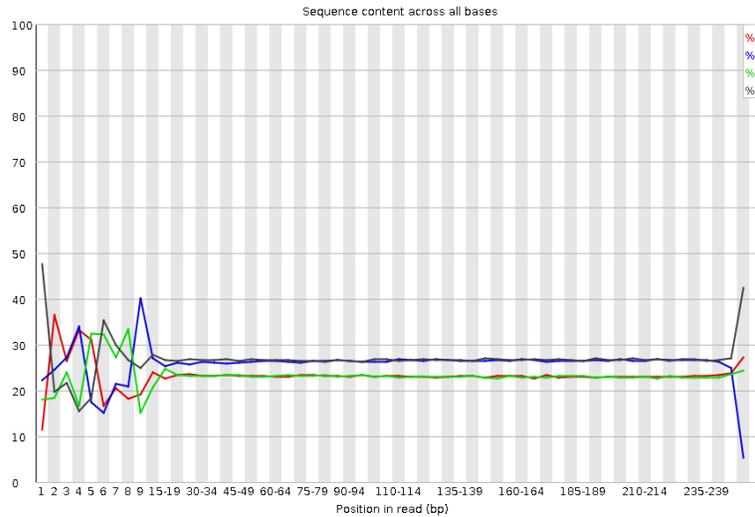


Figura 32. Composición de la secuencia por base a lo largo de la lectura. En el eje de las “X” la posición de las bases, y en el eje de las “Y” la proporción de adenina, timina, guanina y citosina.

Teóricamente, la proporción de cada base debería permanecer relativamente constante a lo largo de las lecturas con $%A=%T$ y $%G=%C$. Sin embargo, algunos tipos de bibliotecas genómicas, como las obtenidas por tagmentación, siempre producen un desvío en la composición de bases al comienzo de la lectura (hasta la posición 15, aproximadamente), el cual se indica como una alerta, o error, en FastQC. Sin embargo, de acuerdo a los desarrolladores de esta herramienta (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), no es necesario corregir este sesgo recortando el principio de las lecturas (*trimming*), ya que no afecta en forma relevante el análisis bioinformático subsiguiente. Por lo tanto, en el análisis de calidad realizado en esta tesis, se verificó que las líneas que representan la composición de bases se mantuvieran constantes y paralelas a partir de la posición 15 de las lecturas.

d) En el contenido de GC por secuencia (*Per sequence GC content*), se analizó la distribución de lecturas en función del %GC (Figura 33). Se debería obtener una distribución aproximadamente normal del %GC, en la cual el pico central debería corresponder al %GC de la especie a la cual pertenece el aislamiento secuenciado. De no observarse esta correspondencia, que implica una contaminación en alguna parte del proceso con el genoma de otra especie, se procedió a secuenciar nuevamente. Sin embargo, también se tuvo en cuenta que podían existir picos del %GC adicionales, de menor tamaño, que deforman la distribución normal, y que podrían corresponder a plásmidos.

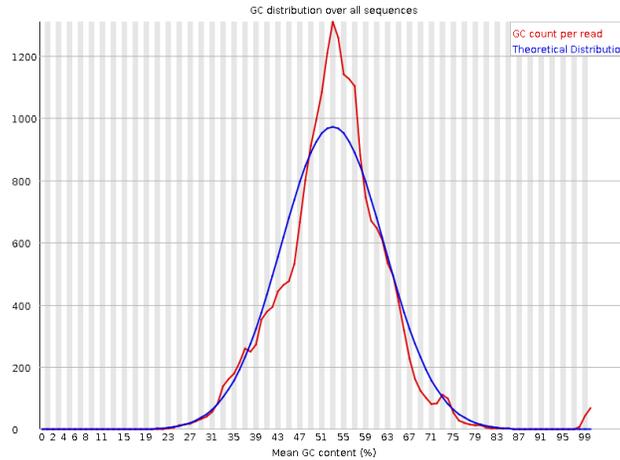


Figura 33. Distribución del contenido de %GC de las lecturas obtenidas. En el eje de las “X” el porcentaje de GC, y en el eje de las “Y” la distribución de secuencias para ese valor de %GC.

e) En el Contenido de Ns por base (*Per base N content*), para cada posición del alineamiento de todas las lecturas obtenidas, se evaluó el porcentaje de veces en las que el secuenciador no pudo asignar ninguna de las cuatro bases canónicas del ADN (asignación de N). En esta tesis, se verificó que no existieran posiciones con porcentajes $\geq 1\%$.

f) En el análisis de Distribución de la longitud de secuencia (*Sequence length distribution*) se evaluó la distribución del largo de todas las lecturas obtenidas en un ensayo de secuenciación (Figura 34). Para establecer la calidad mediante este análisis, se consideró que solo debería observarse un único pico correspondiente a la longitud de secuencia de la tecnología de Illumina utilizada para secuenciar, es decir, 250 pb.

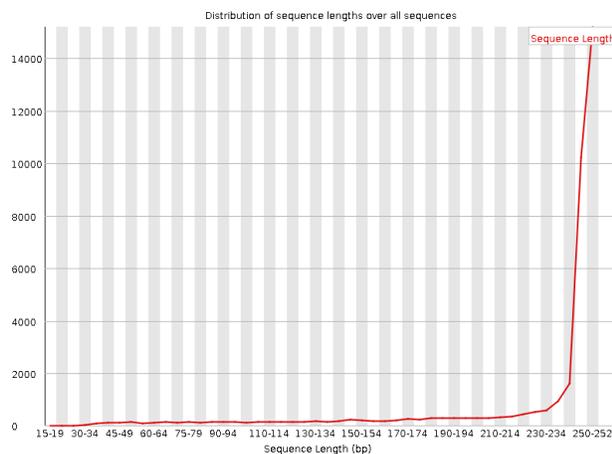


Figura 34: Distribución del largo de las secuencias obtenidas en la secuenciación. En el eje de las “X” largo de las secuencias en pb, y en el eje de las “Y” la cantidad de secuencias obtenidas para ese valor.

g) Análisis de Secuencias duplicadas (*Duplicate sequences*). La gran mayoría de las secuencias de una biblioteca genómica correctamente construida se encuentran solo una vez en

i) Análisis de Contenido de adaptadores (*Adapter content*). Se evaluó si las lecturas obtenidas contenían una cantidad relevante de secuencias de los adaptadores utilizados en NGS. Si bien la configuración predeterminada por defecto (*default*) de FastQC indica una alerta cuando se encuentra una secuencia de un adaptador en más del 5% de las lecturas, en esta tesis se consideró que el conjunto de lecturas de un ensayo de secuenciación no debía mostrar la presencia de ninguna secuencia de adaptadores, ya que fue eliminada en pasos previos.

(b) Control de calidad de las lecturas de Nanopore

El control de calidad de las lecturas obtenidas por ONT se realiza de manera automática con el *software* otorgado por el fabricante. De todas maneras, se realizó un análisis de las métricas obtenidas en la secuenciación mediante el programa “assembly-stats” y se compararon los resultados obtenidos en todos los casos.¹¹⁴

(c) Identificación de la especie

Se identificaron las especies bacterianas mediante el *software* Kraken2 utilizando las lecturas cortas de Illumina sólo en los casos en los que se secuenció con esta técnica el genoma completo.¹¹⁵

(d) Identificación de genes de RAM a partir de lecturas cortas de Illumina

La identificación de genes de RAM a nivel de lecturas cortas de Illumina (no ensambladas) se realizó mediante la herramienta bioinformática ARIBA (versión 2.14.6)¹¹⁶. Esta herramienta se ejecutó por línea de comandos, en un entorno GNU/Linux, y puede utilizar cualquier tipo de base de secuencias de referencia, incluyendo una construida por el mismo usuario (archivo en formato fasta). Brevemente, ARIBA se ejecutó en tres etapas, mediante sendos subcomandos:

A) Primeramente, si se utilizará una base de secuencias de referencia internacional (disponible *online*), se debe obtener esta base para que esté disponible para ARIBA, mediante el subcomando `ariba getref`. En esta tesis, se utilizó la base de secuencias de referencia compilada por ResFinder¹¹⁷:

```
ariba getref resfinder out.resfinder
```

donde `out.resfinder` es el archivo fasta de salida, que contiene las secuencias de referencia que se utilizará en la siguiente etapa.

B) Seguidamente, mediante el subcomando `ariba prepareref`, ARIBA realiza el curado de la base de secuencias de referencia a utilizar, y la clasificación de las mismas en diferentes grupos de similitud (subprograma CD-HIT):

```
ariba prepareref -f out.resfinder.fa -m out.resfinder.tsv
out.resfinder.prepareref
```

donde `out.resfinder.fa` y `out.resfinder.tsv` son los archivos de entrada que contienen las secuencias de referencia y sus metadatos, respectivamente, y `out.resfinder.prepareref` es el directorio de salida, que contiene las secuencias de referencia curadas y clasificadas en diferentes grupos de similitud, y que se utilizará en la siguiente etapa.

C) Finalmente, mediante el subcomando `ariba run` (que invoca diversos subprogramas), ARIBA realiza las siguientes tareas. (i) Un mapeo de las lecturas cortas de Illumina contra cada una de las secuencias de referencia localizada en cada grupo de similitud. (ii) El ensamble local de las lecturas que se alinearon contra una secuencia de referencia dada, lo cual genera un contig que contiene el gen correspondiente a esa secuencia de referencia, o un homólogo del mismo. (iii) La identificación de la secuencia de referencia más cercana a un contig determinado. (iv) La identificación de variantes del gen presente en la secuencia de referencia. En esta etapa, se utilizó el siguiente comando:

```
ariba run out.resfinder.prepareref muestra_R1.fastq.gz
muestra_R2.fastq.gz muestra_out.run
```

donde `muestra_R1.fastq.gz` y `muestra_R2.fastq.gz` son los dos archivos `fastq` con las lecturas de Illumina de una muestra dada, y `muestra_out.run` es el directorio de salida, en donde se guardan los resultados, que comprenden un reporte de los genes identificados en cada grupo de similitud (archivo `.tsv`) y archivos `fasta` de los ensamblajes locales generados.

(e) Ensamblajes de novo

(i) Ensamble de lecturas Illumina

El ensamble *de novo* utilizando sólo las lecturas cortas de Illumina, se realizó mediante la herramienta bioinformática Unicycler (versión 0.4.8-beta) utilizando los parámetros de ensamble configurados por *default* (modo Normal de ensamble).¹¹⁸

(ii) Ensamble Híbrido (Illumina en conjunto con ONT)

El ensamble *de novo* denominado “híbrido” combina las lecturas cortas de Illumina con las lecturas largas de ONT, y se realizó mediante la herramienta bioinformática Unicycler (versión 0.4.8-beta) utilizando los parámetros de ensamble configurados por *default* (modo Normal de ensamble).¹¹⁸ Unicycler se ejecutó por línea de comandos, en entorno GNU/Linux.

```
unicycler -1 READ1.fastq.gz -2 READ2.fastq.gz -o assembly_unicycler --
verbosity 2 --min_fasta_length 250 --keep 3 -t 8
```

En algunos casos se consideró necesario utilizar un método diferente para repetir el ensamblaje. Como método alternativo se utilizó Trycycler (versión 0.5.0), que es una herramienta bioinformática también diseñada para ensamblar genomas bacterianos, pero desarrollada con posterioridad a Unicycler. Trycycler genera ensamblajes utilizando, en primer lugar, las lecturas largas de ONT, a diferencia de Unicycler, que utiliza primero las lecturas cortas de Illumina. Las lecturas largas obtenidas por ONT que se utilizaron para ensamblar mediante Trycycler, se filtraron previamente utilizando Filtrlong (versión 0.2.0) para eliminar aquellas lecturas menores a 1000 pb. Luego de obtener el ensamblaje de las lecturas largas de ONT, para corregir la alta tasa de error resultante de la inferencia de bases (*basecalling*) utilizada en esta tecnología, se emplea polipolish que realiza un “pulido” de dicho ensamblaje mediante la utilización de las lecturas cortas de Illumina¹¹⁹. Trycycler se ejecutó en entorno GNU/Linux, los comandos sugeridos por el creador.¹²⁰

El control de calidad de los ensamblajes *de novo* (realizados con lecturas cortas de Illumina solamente, o por ensamblaje híbrido) se realizó utilizando las métricas de ensamblaje, obtenidas mediante QUAST (versión 5.1.0rc1)¹²¹. Esta herramienta bioinformática se ejecutó en un entorno GNU/Linux, mediante el siguiente comando:

```
quast.py -o output_file archivo.fasta
```

En esta tesis, cuando se secuenció ADN total bacteriano, se estableció como parámetro de calidad de ensamblaje no sea menor al tamaño correspondiente al cromosoma de la especie secuenciada (Por ej, ≥ 5 Mb para *E. coli* y *K. pneumoniae*).

(f) Búsqueda de homólogos de genes PMQR

La búsqueda de homólogos de genes PMQR ya descritos se realizó utilizando secuencias obtenidas por NGS, mediante las siguientes estrategias:

A) Búsqueda de homólogos de genes *qnr* mediante ARIBA. Además de realizar el análisis por ARIBA utilizando ResFinder como se describe más arriba, se construyó una base de secuencias de referencia de todos los genes tipo *qnr*, denominada **qnr_genes.fasta** (111 secuencias). A diferencia de ResFinder, esta base incluyó todos los alelos *qnrE* disponibles en bases de datos internacionales y los identificados en esta tesis (8 secuencias). En la etapa prepareref de ARIBA, se utilizó el siguiente comando:

```
ariba prepareref -all_coding yes -f qnr_genes.fasta qnr_out.dir
```

donde `qnr_out.dir` es el directorio de salida, que contiene las secuencias de referencia de los genes *qnr*. Estas secuencias se utilizaron en la siguiente etapa de ARIBA, mediante el comando:

```
ariba run qnr_out.dir muestra_R1.fastq.gz muestra_R2.fastq.gz
muestra_qnr_out.run
```

donde `muestra_qnr_out.run` es el directorio de salida donde se guardan los resultados.

Cabe aclarar que ARIBA utiliza un valor por *default* del 90% para el mínimo porcentaje de identidad permitido entre una secuencia presente en una muestra y una secuencia de referencia. Este valor mínimo puede cambiarse en el subcomando `ariba run`, utilizando la opción `--nucmer_min_id INT`, donde INT es un número entero que indica dicho valor mínimo. Para incrementar la posibilidad de detectar genes que tuvieran menos de un 90% de identidad con genes PMQR ya descritos, en esta tesis se utilizó dicha opción, con `INT = 70` (genes al menos 70% idénticos a una secuencia de referencia).

B) Búsquedas literales. En primer lugar, se realizó una búsqueda de términos comúnmente utilizados en la descripción de genes PMQR (considerados como palabras clave), utilizando como blanco de la búsqueda los archivos.gff generados en la anotación de secuencias con la herramienta bioinformática PROKKA (ver descripción en el ítem F, de la sección “Análisis de secuencias de plásmidos portadores de genes PMQR”), y mediante el comando `grep` (entorno GNU/Linux):

```
grep -i "<palabra clave>" muestra.gff > archivo_salida.txt
```

En segundo lugar, debido a que las proteínas Qnr poseen un motivo muy conservado denominado Box B, que es esencial para la actividad protectora de la acción de las quinolonas, se compararon los motivos del Box B de todas las proteínas Qnr descritas, para definir secuencias consenso. Además de la mencionada previamente, se realizó otra búsqueda literal empleando dichas secuencias consenso, y utilizando como blanco los archivos.faa generados por PROKKA, que contienen todas las secuencias proteicas inferidas de los ORFs detectados en la secuencia analizada. Se utilizó el siguiente comando:

```
grep -i "<secuencia_>" muestra.faa > archivo_salida.txt
```

C) Búsqueda funcional. Este tipo de búsqueda de homólogos no se basa en la similitud entre genes (como lo que sucede cuando se utiliza ARIBA), sino en la homología de función que puede existir entre la proteína a estudiar y otras que ya tienen una función conocida. Esta búsqueda funcional se realiza utilizando perfiles, o motivos proteicos, determinados por *Hidden Markov Models* (HMMs). Un perfil HMM es un modelo estadístico, basado en un alineamiento múltiple de proteínas homólogas, el cual contiene información específica para cada posición del alineamiento. Brevemente, esta información indica cuán conservado está cada aminoácido localizado en una posición dada, y, por lo tanto, qué aminoácidos es más probable encontrar en las diferentes posiciones del perfil de una proteína homóloga de otras ya conocidas.

Para poder obtener los perfiles HMM de una serie de proteínas homólogas, se debe disponer de una base de secuencias de las mismas. A diferencia de los genes *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*, donde solo se había descrito un tipo de gen en cada caso (con distintos alelos), para los genes *qnr* se habían reportado 7 familias distintas (con diferentes alelos en cada una). Por este motivo,

la búsqueda funcional de homólogos de genes PMQR se limitó a los genes *qnr*. Se construyó una base de secuencias de proteínas Qnr, denominada *qnr_protein.fasta*, que incluyó solo alelos representativos de cada familia (18 secuencias en total, para QnrA, -B, -C, -D, -E, -S y -VC). Se utilizó el programa Pfam (versión 31.0) (*online*: <http://pfam.xfam.org/>; desde enero de 2023: <https://www.ebi.ac.uk/interpro>) para obtener los perfiles HMM comunes a todas las proteínas Qnr incluidas en la base de secuencias utilizadas. Estos perfiles son denominados por Pfam como “dominios PFxxxxx”, donde xxxxx es una serie de cinco números asignada por el programa, y pueden bajarse de la página web del programa como archivos .hmm.

Una vez obtenidos los dominios PFxxxxx, se realizó una búsqueda literal de cada uno de ellos, utilizando como blanco de la búsqueda los archivos .gff generados por PROKKA, y mediante el comando `grep`:

```
grep "PFxxxxx" muestra.gff > archivo_salida.txt
```

Finalmente, se realizó la búsqueda funcional, utilizando cada archivo PFxxxxx.hmm generado por Pfam; el archivo .faa de PROKKA (con todas las secuencias proteicas del aislamiento a analizar), y mediante el programa HMMER, con el comando `hmmsearch` (entorno GNU/Linux):

```
hmmsearch -o archivo_salida.txt --tblout archivo_salida_tab.txt --cpu INT -noali PFxxxxx.hmm muestra.faa
```

donde `archivo_salida.txt` y `archivo_salida_tab.txt` contienen los resultados en formato texto y como tabla, respectivamente, e `INT` es un número entero que indica el número de procesadores solicitado para correr el comando.

(g) Análisis de secuencias de plásmidos portadores de genes PMQR

Las secuencias ensambladas circulares (cerradas) de plásmidos que contenían uno, o más, genes PMQRs se analizaron mediante un esquema de trabajo diseñado específicamente para esta tesis, que incluyó las siguientes herramientas bioinformáticas (Figura 30).

A) Para evaluar los genes de RAM presentes se utilizaron ResFinder (versión 4.1; *online*: <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>)¹²² y AMRFinderPlus (versión 3.10.20)¹²³. Esta última herramienta se ejecutó en entorno GNU/Linux, utilizando el siguiente comando:

```
amrfinder --nucleotide archivo.fasta --output output_name
```

B) Para identificar las replicasas pertenecientes a distintos grupos de plásmidos se utilizó la herramienta bioinformática PlasmidFinder (*online*: <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)¹²⁴. Cuando esta herramienta no pudo identificar ninguna replicasa, se consideró que el plásmido era “no tipificable”

C) Para identificar las regiones conjugativas se utilizó OriTfinder (*online*: <https://bioinformatics.sjtu.edu.cn/oriTfinder/>)¹²⁵. Brevemente, OriTfinder predice la presencia de los cuatro elementos que conforman una región conjugativa: el *oriT*; el gen que codifica para la relaxasa (proteína MOB); el gen que codifica para la proteína de acoplamiento de tipo IV (T4CP), y los genes que codifican para el Sistema de Secreción tipo IV (T4SS). Para este proceso, OriTfinder utiliza una base de datos propia, que incluye (diciembre 2022): 996 secuencias de *oriT* de plásmidos salvajes; 983 secuencias de, al menos, ocho familias de proteínas MOB, y 464 secuencias de T4CP, realizando las búsquedas de proteínas homólogas mediante perfiles HMM. Además, OriTfinder también realiza dos análisis adicionales, de genes de RAM y de virulencia.

D) En cada secuencia de un plásmido portador de genes PMQR, se identificaron las IS presentes mediante la herramienta ISFinder¹²⁶ (*online*: <https://isfinder.biotoul.fr/>), utilizando el algoritmo de búsqueda estándar *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleótidos (BLASTn) incluido en la misma, con la configuración predeterminada por *default*. Se descartaron los resultados en los cuales solo se detectaron fragmentos de IS menores a 200 pb. Solo se consideraron los resultados correspondientes a los elementos transponibles denominados “IS” por ISFinder, es decir, no se consideraron aquellos denominados “Tn”, los cuales corresponden a transposones de la familia Tn3¹²⁷, como TnAs1, TnEc1, TnShfr1, TnXo19, Tn5393, etc. Esta decisión se tomó debido a que varios transposones de esta familia contienen integrones en su estructura. Por lo tanto, cualquier región 5’CS, o 3’CS, de un integrón sería informada por ISFinder como parte de un elemento transponible “Tn”, aun cuando ese integrón no estuviera asociado a un transposón, lo cual complejizaba altamente el análisis a realizar en esta tesis.

Cabe aclarar que varios elementos transponibles incluidos en la base de datos de ISFinder y denominados allí como “IS”, también pertenecen a la familia Tn3, y tienen IRs característicos de esta familia. Algunos de estos elementos, como ISSod9, ISShes11, ISYps3 e IS3000, solo contienen el módulo de transposición y, por lo tanto, una estructura que los relaciona a la gran mayoría de las ISs. Sin embargo, la nomenclatura utilizada en la base de datos de ISFinder es un tanto ambigua, ya que otros de esos elementos pertenecientes a la familia Tn3, como ISAzs17, ISEc63, ISPa38 e ISSba14, tienen los módulos de transposición y resolución de cointegrado, e inclusive, genes pasajeros, es decir, la estructura completa de tres módulos típica de un transposón de la familia Tn3. Por lo tanto, en esta tesis, todos los elementos transponibles identificados como “IS” en ISFinder y pertenecientes a la familia Tn3, se denominaron “IS-familia_Tn3”.

A fin de investigar la presencia de Tn3, y transposones altamente relacionados, como Tn1331 y Tn6238, y dado que la base de datos de ISFinder no incluye estos elementos, la secuencia de cada plásmido portador de genes PMQR se comparó mediante *Nucleotide BLAST* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) con las secuencias de dichos elementos, obtenidas de *GenBank* (números de acceso V00613, AF479774 y KJ511462, respectivamente).

A fin de comparar el contenido de ISs entre diferentes plásmidos portadores de genes PMQR, para cada uno de ellos se definieron los siguientes parámetros:

% de IS = (suma de los tamaños en pb de todas las IS detectadas) x 100 / tamaño del plásmido (en pb)

Densidad de IS = (cantidad total de IS detectadas) x 10⁵ / tamaño del plásmido (en pb), lo cual se expresó como N° de IS / 10⁵ pb.

E) La presencia de integrones se determinó con la herramienta bioinformática Integron Finder (citas) (versión 2.0.1).^{128, 129, 130} Brevemente, esta herramienta detecta independientemente un integrón, una integrasa y sitios *attC*, e incluso puede anotar un casete, si encuentra un ORF adyacente a un *attC*. Los resultados se informan de acuerdo a tres tipos de elementos: integrón completo (con gen de integrasa y sitios *attC* cercanos), elemento In0 (sólo el gen de la integrasa, sin ningún sitio *attC* cercano) y CALIN (región de sitios *attC*, que carece de un gen de integrasa cercano). Integron Finder se ejecutó en forma *online*, a través de la plataforma Galaxy

(https://galaxy.pasteur.fr/root?tool_id=toolshed.pasteur.fr/repos/khillion/integron_finder/integron_finder/2.0.1)

Los resultados de Integron Finder se confirmaron mediante inspección visual de la estructura del integrón, In0, o CALIN detectado.

F) Las secuencias de los plásmidos portadores de PMQR se anotaron con la herramienta bioinformática PROKKA (v 1.14.6) y posterior curación manual¹³¹. Esta herramienta se ejecutó en entorno GNU/Linux, utilizando el siguiente comando:

```
prokka --prefix aislamiento --outdir annotation archivo.fasta --locustag ORF
--strain contig_usado --mincontiglen 300 archivo.fasta
```

G) Cuando fue necesario confirmar la existencia de una estructura genómica no descrita previamente, es decir, verificar tanto la topología de esa estructura, como la continuidad con sus regiones flanqueantes, se realizó un mapeo de las lecturas largas de ONT obtenidas en la secuenciación mediante la cual se determinó esa estructura, contra el contig resultante del ensamble de dichas lecturas. Este procedimiento se denominó mapeo inverso de lecturas largas de ONT y su resultado se consideró satisfactorio solo si se cumplían los siguientes dos criterios: (i) existía un número relevante de lecturas largas que cubrían, en forma continua, la zona de recombinación de la estructura (sitio de unión y sus entornos inmediatos) con cada una de sus regiones flanqueantes, y (ii) el nivel de cobertura de secuencia a lo largo de la estructura y sus regiones flanqueantes era aproximadamente constante, como se indica en la Figura 37.

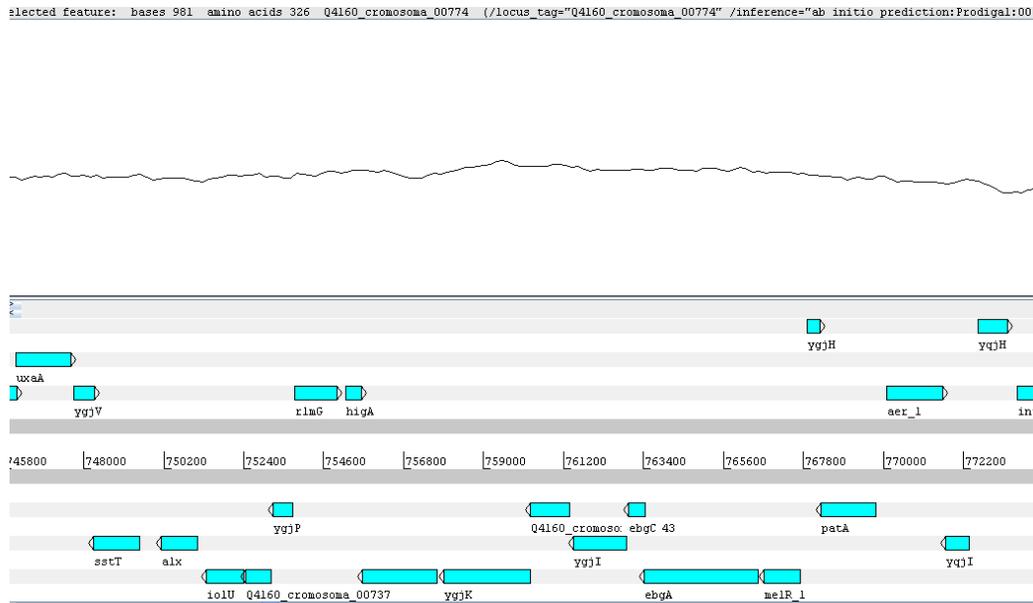


Figura 37. Visualización de un mapeo inverso de lecturas largas de ONT. La línea continua de la parte superior representa la cantidad de lecturas (cobertura) que se observaron en la región mostrada. Las líneas grises centrales representan ambas cadenas de ADN y los números la posición dentro de la secuencia. Las flechas por encima y debajo de las líneas grises representan posibles ORFs y su anotación.

Para realizar el mapeo inverso de lecturas largas de ONT, se utilizó la herramienta bioinformática Minimap2¹³², en entorno GNU/Linux, y mediante el siguiente comando:

```
minimap2 -a contig.fasta lecturas_nanopore.fastq > mapping_minimap.sam
```

(h) Comparación, alineamiento y visualización gráfica de secuencias

La comparación para determinar similitud entre las secuencias incluidas en esta tesis, o entre las mismas y las disponibles en bases de datos internacionales, se realizó en forma *online* mediante *Nucleotide BLAST*, utilizando la base de datos de NCBI *Nucleotide collection (nr/nt)* (NCBI-BD). Además, se utilizó la base de datos de plásmidos bacterianos PLSDb (*online*: <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/>).

La manipulación e inspección visual de secuencias, y alineamientos de secuencias, se realizó con el programa BioEdit (versión 7.0.5.3).¹³³ Para la visualización gráfica de secuencias se utilizó Bandage¹³⁴, la anotación realizada con PROKKA, se analizó con el programa Artemis (versión 17.0.1).¹³⁵ Los alineamientos de secuencias se visualizaron gráficamente con los programas *Artemis Comparative Tool* (ACT; versión 17.0.1)¹³⁶ y *BLAST Ring Image Generator* (BRIG; versión 0.95)¹³⁷. Todos estos programas se ejecutaron en entorno Windows.

Sección 3.09 Análisis de datos estadísticos y visualización

El análisis y la visualización de todos los datos de esta tesis se realizó mediante el paquete de datos ggplot2 bajo el lenguaje de Python (Version v2022.16.1) bajo un entorno de Windows con el programa Visual Studio Code (Version 1.70.0). Las figuras de los ORFs se representaron mediante el software (<https://proksee.ca/>) y los alineamientos se editaron con Adobe Illustrator 1.0.

Resultados

"A veces uno encuentra lo que no está buscando"

- Alexander Fleming

4 Resultados Objetivo I

En estudios previos a esta tesis, en el marco del Proyecto de Resistencia a Quinolonas de nuestro grupo, se analizó un total de 1163 aislamientos clínicos de Enterobacteriales de todo el país. Se identificaron PMQRs ya descritos y se estimó su prevalencia. Un total de 46 de esos aislamientos, mostraron un fenotipo de sensibilidad a quinolonas compatibles con PMQRs, pero no se pudo identificar mediante PCR ninguno de los genes ya descritos. Este grupo de aislamientos se denominó “Aislamientos con Fenotipos PMQRs”. Los datos epidemiológicos de los aislamientos se detallan en la Tabla 5. En uno de esos 46 aislamientos, *K. pneumoniae* Q1130, se identificó el plásmido conjugativo denominado pKP1130, de 185 kb (estimado por endonucleasa S1), portador de *qnrE1*. De acuerdo a la nomenclatura propuesta en esta tesis, este plásmido se renombró como pKpn_Q1130_193. El análisis filogenético demostró que *qnrE1* era el primer miembro de una nueva familia de genes tipo *qnr*. El análisis de entornos genéticos indicó que *qnrE1* habría sido movilizado desde el cromosoma de *Enterobacter spp.* al pKpn_Q1130_193, por la secuencia de inserción *ISEcp1*.³⁶ Además, poco tiempo después de la descripción de *qnrE1* de nuestro grupo, este gen también se describió en el aislamiento *K. pneumoniae* Kp41 de Brasil, donde *qnrE1* también estaba asociado a *ISEcp1*.¹⁰⁰

Tabla 5. Datos epidemiológicos de los 46 aislamientos con fenotipos PMQRs.

Aislamiento Clínicos	Especie	Fecha	Hospital	Zona	Tipo de muestra
M7130	<i>K. pneumoniae</i>	Marzo 2005	Dr. Ricardo Gutiérrez	CABA	líquido cefaloraquídeo
M7220	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2005	Dr. Ricardo Gutiérrez	CABA	orina
M7395	<i>K. pneumoniae</i>	Junio 2005	Dr. Ricardo Gutiérrez	CABA	orina
M9146	<i>K. pneumoniae</i>	Noviembre 2006	Garrahan	CABA	herida quirúrgica
M9158	<i>K. pneumoniae</i>	Diciembre 2006	Dr. Ricardo Gutiérrez	CABA	aspirado traqueal
M9257	<i>K. variicola</i>	Abril 2007	Parmenio Piñero	CABA	orina
M9415	<i>K. pneumoniae</i>	Julio 2007	Dr. Ricardo Gutiérrez	CABA	hemocultivo
M9491	<i>K. pneumoniae</i>	Agosto 2007	Víctor J. Vilela	Santa Fé	hemocultivo
M9497	<i>K. pneumoniae</i>	Agosto 2007	Víctor J. Vilela	Santa Fé	orina y sangre
M9508	<i>Proteus mirabilis</i>	Septiembre 2007	Clin. Reina Fabiola	Córdoba	absceso
M9661	<i>K. pneumoniae</i>	Enero 2008	Parmenio Piñero	CABA	orina
M9662	<i>K. pneumoniae</i>	Enero 2008	Parmenio Piñero	CABA	orina

Resultados Objetivo I - Análisis de datos estadísticos y visualización

M9773	<i>E. clocae</i>	Abril 2008	Clin. Reina Fabiola	Córdoba	orina
Q1040	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Rawson	Córdoba	hemocultivo
Q1052	<i>P. stuartii</i>	Abril 2007	Dr. Juan A. Fernández	CABA	S/D
Q1105	<i>M. morgani</i>	Abril 2007	El Dorado	Misiones	orina
Q1130	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Centro de Microbiología Médica	Tucumán	orina
Q1184	<i>P. stuartii</i>	Abril 2007	Pasteur V. María	Córdoba	herida
Q1215	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Dr. Ramón Carrillo	Sgo. del Estero	orina
Q2036	<i>E. Asburiae</i>	Abril 2007	Eva Perón	San Martín, GBA	absceso
Q2042	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Dr. Juan A. Fernández	CABA	hemocultivo
Q2082	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Garrahan	CABA	orina
Q2091	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Dr. Julio C. Perrando	Chaco	orina
Q2117	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Ángel C. Padilla	Tucumán	absceso
Q3036	<i>E. clocae</i>	Abril 2007	Eva Perón	San Martín, GBA	piel y partes blandas
Q3093	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Dr. Cosme Argerich	CABA	orina
Q3104	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Evita	Lanus, GBA	hemocultivo
Q3116	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Ángel C. Padilla	Tucumán	piel y partes blandas
Q3117	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Ángel C. Padilla	Tucumán	piel y partes blandas
Q3160	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	José María Penna	CABA	absceso
Q3177	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Central	Mendoza	orina
Q4014	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Parmenio Piñero	CABA	piel y partes blandas
Q4022	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Rawson	Córdoba	orina
Q4067	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Garrahan	CABA	orina
Q4079	<i>E. Asburiae</i>	Abril 2007	Dr. Julio C. Perrando	Chaco	orina
Q4081	<i>E. clocae</i>	Abril 2007	Dr. Julio C. Perrando	Chaco	orina
Q4082	<i>E. clocae</i>	Abril 2007	Dr. Julio C. Perrando	Chaco	orina
Q4115	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Ángel C. Padilla	Tucumán	orina

Q4136	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	José María Cullen	Santa Fé	orina
Q4137	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	José María Cullen	Santa Fé	orina
Q4182	<i>E. cloacae</i>	Abril 2007	Madre y el Niño	Formosa	orina
Q5010	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Dr. Castro Rendon	Neuquen	orina
Q5100	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Dr. Julio C. Perrando	Chaco	hemocultivo
Q5120	<i>Proteus mirabilis</i>	Abril 2007	Centro de Microbiología Médica	Tucumán	orina
Q5121	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	San Juan de Dios	Ramos Mejía, GBA	hemocultivo
Q5184	<i>E. coli</i>	Abril 2007	José María Penna	CABA	orina

S/D= Sin datos. CABA = Ciudad Autónoma de Buenos Aires. GBA= Gran Buenos Aires.

(a) Identificación de *qnrE*

Para abordar el Objetivo General I de esta tesis, es decir identificar y caracterizar nuevos genes de PMQRs, en primer lugar, se realizó una búsqueda en NCBI-BD (marzo 2018), que mostró la presencia de cinco variantes alélicas de *qnrE1*. Cuatro de estos cinco alelos estaban localizados en el cromosoma de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter asburiae*, por lo que se denominaron siguiendo la nomenclatura propuesta para genes *qnr* cromosómicos, es decir, indicando la familia *qnr* a la cual pertenecían, las iniciales del microorganismo (género y especie), y el nombre de la cepa en la cual se identificaron².⁵⁹ Así, los cuatro alelos cromosómicos de *qnrE1* fueron: *qnrE_Eas_L1*, *qnrE_Eas_CAV1043*, *qnrE_Ecl_MBRL1077* y *qnrE_Eas_ENIPBJ-CG1*. El alelo restante se denominó *qnrE2*, porque estaba localizado en un plásmido (pEC422_1), encontrado en un aislamiento de *E coli* de Ecuador (reporte de NCBI-BD no publicado).

En segundo lugar, con las secuencias de todos los alelos de *qnrE* encontrados, se diseñaron primers y se implementó una PCR que permite la detección de todos los genes *qnrE* descriptos hasta el presente (Tabla 6).

Tabla 6. Primers diseñados para amplificar la familia *qnrE*.

Nombre del primer	Secuencia
qnrEnt-F	5'-CGGYACGGATTTAACCAGCWCG -'3
qnrEnt-R	5'- GTCGCTCCATCARCTGGGMAA-'3

² Para los homólogos cromosómicos de *qnrE1*, no se pudieron asignar números correlativos (por ejemplo, *qnrE2*, *qnrE3*, *qnrE4*, etc.) debido a que el repositorio de genes de referencia para PMQRs (NCBI- *Reference Gene Catalog*), solo otorga dicha numeración a los homólogos para los cuales se ha demostrado que confieren resistencia a quinolonas, ya sea porque eran plasmídicos (transferibles por conjugación o transformación), o porque se clonaron y expresaron en bacterias sensibles.

Utilizando este ensayo en el grupo de Aislamientos con Fenotipos PMQRs, se encontraron 3 aislamientos con resultado positivos: *Klebsiella variicola* (Kva) M9257 y *E. cloacae* M9773 de la colección A, y *E. cloacae* Q3036 de la colección B. Los amplicones obtenidos se secuenciaron por Sanger y se determinó que *Kva* M9257 contenía *qnrE1*, mientras que *E. cloacae* M9773 tenía el alelo *qnrE_Eas_CAV1043*, y *E. cloacae* Q3036 un alelo no descrito previamente, que se denominó *qnrE_Ecl_Q3036*.

Se realizó un alineamiento de todos los genes *qnrE* y sus productos proteicos derivados, y se determinó el porcentaje de identidad nucleotídica y aminoacídica entre ellos (Figura 38). El nuevo alelo *qnrE_Ecl_Q3036*, detectado en esta tesis, mostró un 98.8% de identidad con *qnrE1* y la proteína inferida sólo tuvo 1 aminoácido de diferencia con QnrE1.

% identidad nucleotídica						
	<i>qnrE1</i>	<i>qnrE_Eas_L1</i>	<i>qnrE_Eas_CAV1043</i>	<i>qnrE_Ecl_MBRL1077</i>	<i>qnrE_Eas_ENIPBJ-CG1</i>	<i>qnrE2</i>
<i>qnrE_Eas_L1</i>	92,6					
<i>qnrE_Eas_CAV1043</i>	93,5	98,1				
<i>qnrE_Ecl_MBRL1077</i>	96,4	93,0	93,3			
<i>qnrE_Eas_ENIPBJ-CG1</i>	93,3	97,7	99,5	93,0		
<i>qnrE2</i>	98,8	91,9	92,9	96,0	92,7	
<i>qnrE_Ecl_Q3036</i>	98,8	92,2	93,2	96,0	93,0	98,4

N de aminoácidos de diferencia						
	QnrE_Eas_L1	QnrE_Eas_CAV1043	QnrE_Ecl_MBRL1077	QnrE_Eas_ENIPBJ-CG1	QnrE2	<i>qnrE_Ecl_Q3036</i>
QnrE1	11	10	6	11	2	1
QnrE_Eas_L1		3	9	4	11	10
QnrE_Eas_CAV1043			8	1	10	9
QnrE_Ecl_MBRL1077				9	6	5
QnrE_Eas_ENIPBJ-CG1					11	10
QnrE2						1

Figura 38. Comparación entre diferentes alelos de la familia *qnrE* y sus proteínas inferidas. Arriba se muestra el porcentaje de identidad nucleotídica entre distintos alelos, y abajo el número de aminoácidos de diferencia entre las proteínas inferidas. El mayor porcentaje de identidad para el nuevo alelo *qnrE_Ecl_Q3036* está resaltado en verde. Números de acceso de NCBI-BD: *qnrE_Eas_L1*: CP007546, *qnrE_Eas_CAV1043*: CP011591, *qnrE_Ecl_MBRL1077*: CP014280, *qnrE_Eas_ENIPBJ-CG1*: CP014993, *qnrE2*: CP018961.

Los 3 aislamientos que contenían alelos *qnrE*, se conjugaron con *E. coli* J53 Az-R, obteniéndose transconjugante sólo para *Kva* M9257 (portador de *qnrE1*). Esto sugirió que los alelos *qnrE_Eas_CAV1043* y *qnrE_Ecl_Q3036*, detectados en los aislamientos M9773 y Q3036, respectivamente, estaban localizados en el cromosoma, de acuerdo a lo descrito para todos los alelos *qnrE* de *Enterobacter* spp. encontrados en NCBI-BD.

(b) Secuenciación y análisis bioinformático de aislamientos portadores de *qnrE*

En los 3 aislamientos con alelos *qnrE* se realizó NGS con el método Illumina. En cada caso, se identificaron los contigs que contenían los alelos *qnrE* y estos contigs se compararon con los entornos inmediatos de los genes *qnrE* de los alelos encontrados en NCBI-BD, realizando un alineamiento múltiple. En los aislamientos de *E. cloacae* M9773 y Q3036, se observó que los genes *qnrE_Eas_CAV1043* y *qnrE_Ecl_Q3036* estaban flanqueados por regiones muy similares a las observadas en todos los alelos *qnrE* cromosómicos de *Enterobacter spp.* encontrados en NCBI-BD. Los entornos inmediatos de los alelos *qnrE* de M9773 y Q3036 mostraron 85% de identidad (Figura 39).

En cambio, en Kva M9257, *qnrE1* estaba flanqueado río arriba por *ISEcp1*, y río abajo, por *araJ* y el gen *ahp*, pero con una delección en su extremo 5' de este último. Sin embargo, cuando se compararon las secuencias inmediatamente flanqueantes a la estructura *qnrE1/araJ/Δahp* de M9257, Q1130, y del aislamiento de Brasil, Kp41, se observó que eran de diferente longitud (Figura 39). Este resultado sugirió que se habrían producido eventos independientes de captura de *qnrE1* en el cromosoma de *Enterobacter spp.*, mediados por *ISEcp1*, generando las estructuras presentes en los aislamientos M9257, Q1130 y Kp41. Un análisis más detallado de estas estructuras, que se presenta en la sección Análisis de los entornos genéticos de los PMQRs, apartado *qnrE1*, corroboró esta hipótesis.

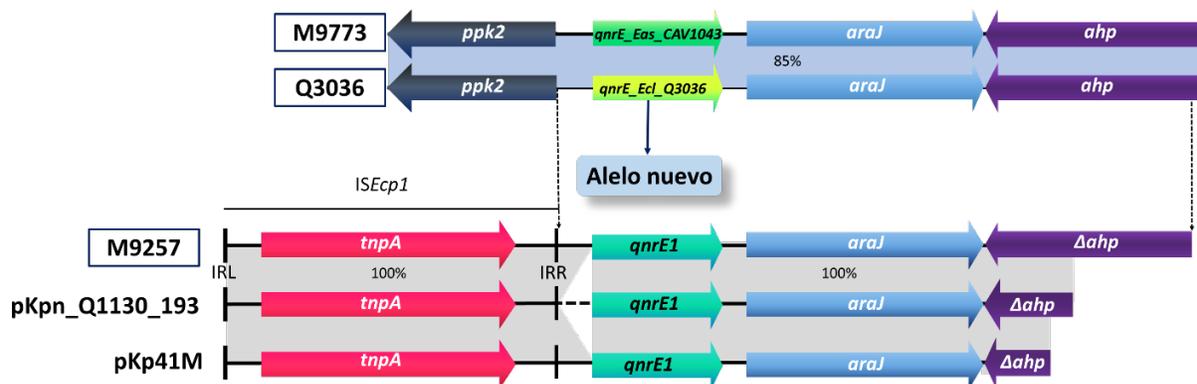


Figura 39. Comparación de entornos genéticos de alelos *qnrE* cromosómicos y plasmídicos. Las flechas gruesas representan genes e indican sus sentidos transcripcionales. Las zonas sombreadas en gris, o en azul, indican identidad nucleotídica entre los elementos incluidos en cada una de ellas. En la parte de arriba de la figura se muestran los entornos de los dos aislamientos de *E. cloacae*, M9773 y Q3036, que contenían los genes cromosómicos *qnrE_Eas_CAV1043* y *qnrE_Ecl_Q3036*. Río arriba de estos alelos se indica el gen cromosómico *ppk2* (codifica para una polifosfato kinasa), ausente en los entornos de los genes *qnrE1* plasmídicos, que se muestran en la parte de abajo de la figura, y que estaban flanqueados por *ISEcp1*, (se indican los IRR e IRL con barras verticales). Las líneas verticales de guiones con flechas indican la región del cromosoma de *Enterobacter spp.* presente en la estructura *qnrE1/araJ/Δahp* de M9257 [*araJ* y *ahp* codifican para un transportador perteneciente a la Superfamilia Principal de Facilitadores (*Major Facilitator Superfamily*, MFS) y para una alquil hidroxperoxidasa, respectivamente]. El número de acceso de NCBI-BD para pKp41M es KY781949.

Los hallazgos previos³⁶ y los mostrados en la Figura 39 donde se analizaron los entornos del gen *qnrE* sugieren que *Enterobacter spp.* podría ser un reservorio natural de esta familia de genes. Con la PCR diseñada para estos genes, se realizó la búsqueda de *qnrE* en el resto de los aislamientos de *Enterobacter spp.* de ambas colecciones: 6 *E. cloacae* y 1 *Enterobacter kobei* de la colección A y 37 *E. cloacae* de la colección B. No se obtuvieron resultados positivos para ninguno de estos 44 aislamientos. En base a la colección B, que corresponde a aislamientos consecutivos no duplicados recolectados en un período de 5 días, se pudo estimar una prevalencia de 2,6% (1/38) para los genes *qnrE* en *E. cloacae*, donde Q3036 fue el único aislamiento positivo para este gen.

(c) Búsqueda de nuevos PMQRs mediante conjugación biparental

Luego de determinar la presencia de los genes *qnrE* en *K. pneumoniae* Q1130, *K. variicola* M9257, *E. cloacae* Q3036 y *E. cloacae* M9773, y con el fin de analizar la posible presencia de genes PMQRs transferibles por conjugación en el resto de los 42 Aislamientos con Fenotipo PMQRs, se realizaron ensayos de conjugación biparental a 35°C. A pesar de que se hicieron al menos tres repeticiones de los ensayos para cada uno de estos 42 aislamientos, no se pudieron obtener transconjugantes con Fenotipo PMQRs.

En base a reportes previos se describió que la síntesis del *pilus* sexual de los plásmidos del grupo HI es termosensible, y que la conjugación de este grupo de plásmidos sería óptima entre los 22°C y los 30°C.³¹ Es decir que a 35°C (la temperatura en la que se realizaron los ensayos de conjugación de este trabajo), se inhibiría la conjugación de este grupo de plásmidos. Por lo tanto, teniendo en cuenta la posibilidad de que los genes codificantes para el Fenotipo PMQRs en estos 42 aislamientos en los cuales no se obtuvieron transconjugantes estuvieran presentes en plásmidos del grupo HI, se realizó una PCR que amplificaba los replicones del grupo HI. No se obtuvo amplificación en ninguno de los casos ensayados, lo que descartaría la posible presencia de genes PMQRs en plásmidos del grupo HI en estos aislamientos.

(d) Búsqueda bioinformática de nuevos PMQRs

Para analizar la posible presencia de homólogos de los genes PMQRs, pero localizados en plásmidos no conjugativos, se hizo secuenciación completa de genoma por el método de Illumina de 21 aislamientos representativos (diferentes especies bacterianas, hospitales y perfiles fenotípicos) de los 42 Aislamientos con Fenotipo PMQRs en estudio. Con las 21 secuencias obtenidas, se realizaron los siguientes análisis:

A) Búsqueda de genes homólogos a los genes *qnr* con identidad $\geq 70\%$, mediante la herramienta bioinformática ARIBA. Con esta estrategia no se detectaron homólogos de genes *qnr* en los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados.

B) Búsquedas literales (mediante el comando `grep`). Primeramente, se realizaron búsquedas en el archivo `.gff` de anotación de secuencias (obtenidas por Prokka), de términos comúnmente incluidos en la descripción de genes PMQR, utilizando las palabras clave “quinolone”, “qnr”, “aac(6’)” y “qepA”. No se detectaron aciertos que correspondieran a homólogos de genes PMQR en los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados mediante estas metodologías.

En segundo lugar, dado que las proteínas Qnr poseen el motivo Box B, muy conservado y esencial para la actividad protectora de la acción de las quinolonas, se compararon las secuencias de este motivo de todas las proteínas Qnr codificadas en plásmidos (103 secuencias; octubre 2018). Se definieron las siguientes secuencias aminoacídicas consenso:

- i) KMYFCS: para las proteínas QnrA, QnrC, QnrVC1, QnrVC3 y QnrVC6.
- ii) RMYFCS: para las proteínas QnrS, QnrVC4, QnrVC5 y QnrVC7.
- iii) MNMITTR: para las proteínas QnrB, QnrD, QnrE1 y QnrE2.

Se realizó una búsqueda literal de estas tres secuencias en el archivo `.faa` de anotación de secuencias (obtenidas por Prokka), que contiene todas las secuencias proteicas inferidas de los ORFs detectados en la secuencia. Como control del método, se utilizaron los archivos `.faa` de la anotación de las secuencias de los aislamientos portadores de alelos *qnrE*, *E. cloacae* M9773, *E. cloacae* Q3036 y *K. variicola* M9257, y fueron los únicos para los cuales se obtuvieron resultados positivos. Considerando la alta conservación de los motivos de Box B de las proteínas Qnr, este resultado descarta la posible presencia de genes *qnr* en los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados.

C) Búsquedas funcionales. Mediante el programa HMMER y utilizando la base de secuencias de proteínas Qnr descrita en Materiales y Métodos (`qnr_protein.fasta`), se encontraron dos dominios, denominados PF00805 y PF13599 (40 y 77 amino ácidos, respectivamente), que fueron detectados en las 18 secuencias proteicas que constituían la base `qnr_protein.fasta`. Estos dominios estaban constituidos por repeticiones de los pentapéptidos característicos de las proteínas Qnr. PF00805 contenía 8 repeticiones de la secuencia consenso A(D/N)(L/F)XX, mientras que PF13599 estaba compuesto por 14 repeticiones con la secuencia consenso XX(F/L)XX-seguido de 7 amino ácidos XLXXXX(F/L) (Figura 40).

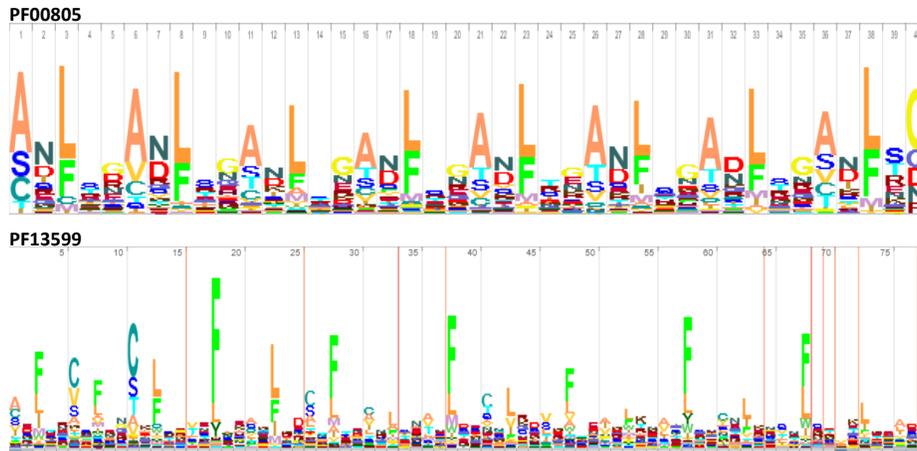


Figura 40. Dominios PF00805 y PF13599 detectados en todas las proteínas Qnr. Se muestran las 40 y 77 posiciones de cada dominio, respectivamente, y en cada posición, se indican los amino ácidos por su código IUPAC, siendo la altura de la letra proporcional a la probabilidad de ocurrencia del amino ácido en esa posición.

Con cada dominio, se realizaron búsquedas literales (comando `grep`) en los archivos `.gff` de la anotación de las secuencias de los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados. Se obtuvieron 6 aciertos y 15 resultados negativos. En todos los casos, los aciertos obtenidos correspondieron a posibles homólogos de proteínas Qnr, pero codificados en el cromosoma. Además, con cada dominio se realizaron búsquedas funcionales (comando `hmmsearch` del programa HMMER) en los archivos `.faa` de la anotación de las secuencias de los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados. Se obtuvieron los mismos resultados que los obtenidos mediante las búsquedas literales mencionadas previamente. Si bien en estos análisis no se encontraron homólogos de Qnr plasmídicos, el clonado y caracterización de los posibles homólogos cromosómicos, será tema de futuros estudios permitiendo la apertura de nuevas líneas de investigación.

D) Finalmente, se realizó una búsqueda mediante BLASTn (julio de 2019) de homólogos de *crpP*, un nuevo gen de PMQRs descrito en México durante la realización de esta tesis.¹³⁸ Utilizando un límite inferior de 80% de identidad, no se detectó ningún gen homólogo a *crpP* en los 21 Aislamientos con Fenotipo PMQRs secuenciados.

Como conclusión del primer objetivo general propuesto, además del alelo *qnrE1* reportado previamente a esta tesis, se identificaron y caracterizaron otros alelos *qnrE* cromosómicos, un posible reservorio de estos genes en el cromosoma de *Enterobacter spp.*, y se estimó la prevalencia de genes *qnrE* en *E. cloacae*. Además, se implementó un sistema de detección molecular basado en PCR para la nueva familia *qnrE*. Por otra parte, si bien no se identificaron otros mecanismos movilizables en los aislamientos restantes, es posible que el fenotipo con sensibilidad reducida a quinolonas se deba a algún mecanismo cromosómico que limiten la entrada de los ATBs en la célula bacteriana o la expulsen, como impermeabilidad o bombas de flujo.

5 Resultados Objetivo II

Con el objetivo de analizar los plásmidos portadores de los genes PMQRs circulantes en nuestro país, se realizó una selección de plásmidos, que se denominó “plasmoteca”. En este capítulo se describirán secuencialmente los pasos para lograr dicho objetivo. Para esto, se seleccionaron aislamientos clínicos de Enterobacteriales con distintos PMQRs, y se realizaron conjugaciones biparentales a una misma cepa de *E. coli* J53. Se empleó esta estrategia a fin de analizar la capacidad de transferencia horizontal de cada plásmido, obteniendo, al mismo tiempo, la colección de plásmidos en un “ambiente” isogénico. En la gran mayoría de los casos se obtuvieron transconjugantes y se analizó el perfil de los plásmidos transferidos. Luego, aplicando técnicas de NGS y análisis bioinformático, se realizó el estudio de los plásmidos portadores de PMQRs, focalizándolo especialmente en los mecanismos genéticos que ayudaron a la diseminación de estos mecanismos (transferencia horizontal, transposición, recombinación, fusiones y separación de replicones, etc.).

Sección 5.01 Selección de aislamientos

A partir de los 1163 aislamientos clínicos de Enterobacteriales de las Colecciones A y B, junto con 5 aislamientos adicionales, provenientes de otros estudios de nuestro grupo (ver sección 3.01), se seleccionaron todos los aislamientos portadores de genes de PMQRs (n=124). Los aislamientos pertenecientes a la Colección A, y los 5 adicionales identificados en otros estudios de nuestro grupo, tienen una “M” al principio de su código de identificación, mientras que los pertenecientes a la Colección B, tienen una “Q” en el inicio de código de identificación. Del grupo de 124 aislamientos portadores de genes PMQRs, se descartaron seis aislamientos con genes *qnrE* (2) y *qnrB* (4) localizados en el cromosoma, y 31 con genes *qnrD1* (2) y *qnrB19* (29) codificados en plásmidos menores a 3,1 kb y que ya fueron caracterizados^{83,99}, lo cual resultó en un total de 87 aislamientos (Figura 41).

Selección de Aislamientos

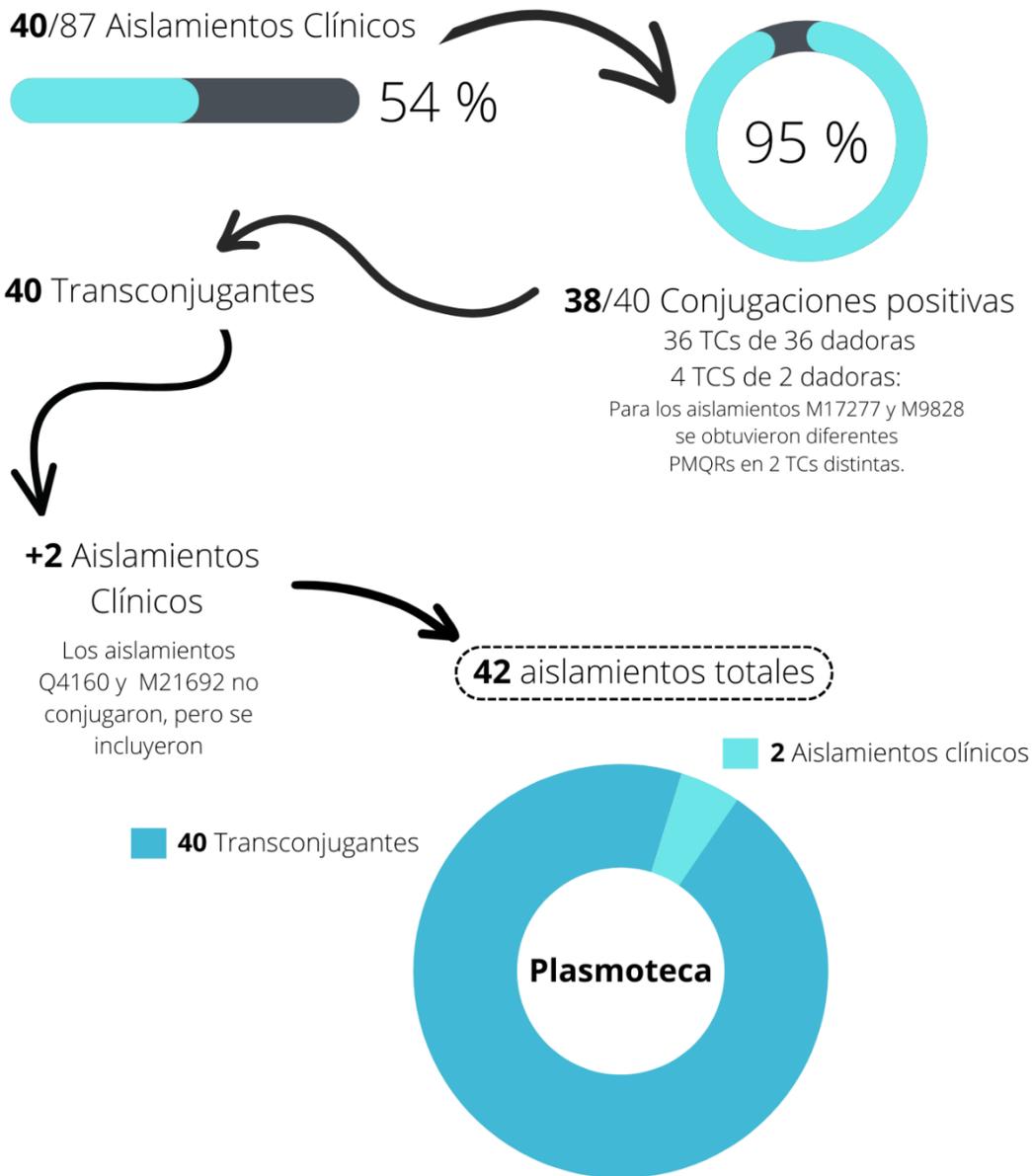


Figura 41. Esquema para la selección de cepas para la plasmoteca. Se seleccionaron 40 aislamientos representativos de la colección de 87 definida previamente y se obtuvieron 38 conjugaciones positivas y 2 negativas. En dos de los 38 ensayos positivos, se obtuvieron 2 transconjugantes con diferentes genes de PMQRs, para cada uno de los 2 aislamientos dadores (M17277 y M9828) y por esta razón se detalla en el esquema como “40 Transconjugantes”. Además, los dos aislamientos que no se pudieron conjugarse se incluyeron como aislamientos clínicos, por esto se agregó la leyenda “+2 Aislamientos clínicos”. Por lo tanto, la plasmoteca se construyó a partir de 40 transconjugantes y 2 aislamientos clínicos.

Como se mencionó en Materiales y Métodos, en todos los aislamientos clínicos se había identificado la especie bacteriana mediante pruebas bioquímicas. En este trabajo, para

corroborar esta identificación, los 87 aislamientos seleccionados, se identificaron también mediante la técnica de MALDI-TOF. Sólo se obtuvieron diferentes especies para: *K. variicola* M7943, identificado por pruebas bioquímicas como *K. pneumoniae*, y *E. kobei* M9921, identificado previamente como *E. cloacae*, las cuales fueron corregidas según el resultado de MALDI-TOF.

A partir de estos 87 aislamientos clínicos con PMQRs, se seleccionaron 40 aislamientos representativos Figura 41, es decir, aquellos de distintas especies de Enterobacteriales y que contenían diferentes genes de PMQRs, o sus distintas combinaciones presentes en un mismo aislamiento, y finalmente, si las tres características anteriores eran iguales, se seleccionaron aislamientos de distintos hospitales. Los datos epidemiológicos (especie bacteriana, fecha de aislamiento, hospital, tipo de muestra y PMQR) de cada aislamiento se muestran en la Tabla 7, y la localización geográfica de los hospitales en los que se recolectaron los aislamientos se muestra en la Figura S1.

Sección 5.02 Conjugaciones biparentales

Los 40 aislamientos clínicos seleccionados, se conjugaron con *E. coli* J53 Az-R. Se obtuvieron transconjugantes para 38/40 aislamientos (Figura 41). Cabe destacar que los aislamientos Q1130 y M9257 del Objetivo I están incluidos en estas 38 conjugaciones positivas. En dos casos, *K. pneumoniae* M9828 y *K. quasipneumoniae* M17277, se obtuvieron dos transconjugantes con diferentes genes PMQRs para cada aislamiento dador. En el primer caso (M9828) se transfirieron separadamente los genes *aac(6')-Ib-cr5* y *qnrB10* a las transconjugantes TC-M23438 y TC-M23439, respectivamente. En el otro aislamiento (M17277), se transfirieron tres genes de PMQRs a dos transconjugantes diferentes: TC-M25520 con *qnrB4*, y TC-M25207 con *qnrB52* más *aac(6')-Ib-cr5*. Por lo tanto, a partir de 38 aislamientos clínicos se obtuvo un total de 40 transconjugantes que integraron la plasmoteca. Además, para dos aislamientos clínicos, *E. coli* Q4160 y *K.pneumoniae* M21692 no se obtuvieron transconjugantes. Para poder estudiar los plásmidos portadores de PMQRs, estos aislamientos se agregaron a la plasmoteca. Por lo tanto, el número final de cepas en la plasmoteca fue de **42**: 40 transconjugantes y 2 aislamientos clínicos (Figura 41).

En las transconjugantes obtenidas, además de confirmar la presencia de los genes PMQRs transferidos mediante PCR, se corroboró la transferencia de un fenotipo compatible con la presencia de estos mecanismos, analizando el perfil de sensibilidad a quinolonas y aminoglicósidos, por el método de difusión con discos (ver el anexo Información suplementaria, Tabla S1 y Figura S2).

Tabla 7. Datos epidemiológicos de los 40 aislamientos seleccionados para la plasmoteca.

Aislamiento Clínicos	Especie	Fecha aislamiento	Hospital	Localización	Tipo de muestra	PMQRs
M11007	<i>K. oxytoca</i>	Septiembre 2008	Dr. Juan A. Fernández	CABA	orina con sonda	<i>qnrS1</i>
M11059	<i>E. coli</i>	Noviembre 2008	R. Gutiérrez	CABA	flujo vaginal	<i>qnrB19</i>
M11085	<i>K. pneumoniae</i>	Diciembre 2008	Evita	Lanus, GBA	aspirado traqueal	<i>qnrB10</i>
M17277	<i>K. quasipneumoniae</i>	Marzo 2014	R. Gutiérrez	CABA	screening	<i>qnrB4,</i> <i>qnrB52</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M17464	<i>E. cloacae</i>	Junio 2014	R. Gutiérrez	CABA	screening	<i>qnrA1</i>
M21014	<i>K. pneumoniae</i>	Marzo 2016	R. Gutiérrez	CABA	screening	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M21692	<i>E. cloacae</i>	Octubre 2016 Abril 2017	Eva Perón, San Martín	CABA	hemocultivo	<i>qnrE1</i> <i>aac(6')-lb-cr7</i>
M22246	<i>P. stuartii</i>	Junio 2006	Pirovano	CABA	aspirado traqueal	<i>qnrB1</i>
M7916	<i>E. cloacae</i>	Junio 2006	Pte. Peron	Avellaneda GBA	N/C	<i>qnrB10</i>
M7943	<i>K. variicola</i>	Diciembre 2006	Favaloro	CABA	hemocultivo	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9167	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Rawson Cordoba	CORDOBA	orina con sonda	<i>qnrS1</i>
M9257	<i>K. variicola</i>	Abril 2007	Parmenio Piñero	CABA	orina	<i>qnrE1</i>
M9272	<i>M. morgani</i>	Abril 2007	José María Penna	CABA	tejido pseudoaneurisma	<i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9306	<i>K. pneumoniae</i>	Mayo 2005	R. Gutiérrez	CABA	líquido cefaloraquídeo	<i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9314	<i>K. pneumoniae</i>	Agosto 2007	Favaloro	CABA	orina	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9518	<i>E. Asburiae</i>	Enero 2008	Dr. Juan A. Fernández	CABA	herida quirúrgica	<i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9684	<i>S. marcescens</i>	Abril 2008	Evita	Lanus, GBA	hemocultivo	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-lb-cr7</i>
M9820	<i>E. coli</i>	Mayo 2008	Parmenio Piñero	CABA	líquido abdominal	<i>qnrB19</i>
M9828	<i>K. pneumoniae</i>	Junio 2008	Cuatro de Junio	Roque Saenz Peña	orina	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9863	<i>K. pneumoniae</i>	Julio 2008	Masvernat	ENTRE RIOS	absceso, orina	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9902	<i>E. coli</i>	Agosto 2008	Dr. Cosme Argerich	CABA	líquido abdominal	<i>qnrB2</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9921	<i>E. kobei</i>	Julio 2008	Evita	Lanus, GBA	hemocultivo	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-lb-cr7</i>
M9932	<i>K. pneumoniae</i>	Octubre 2008	Parmenio Piñero	CABA	orina	<i>qnrS1</i> <i>aac(6')-lb-cr5</i>
M9966	<i>Salmonella spp.</i>	Agosto 2008	Evita	Lanus, GBA	coprocultivo	<i>qnrB2</i>
M9992	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Policlínico Central	SAN LUIS	herida quirúrgica	<i>aac(6')-lb-cr7</i>
Q1130	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007 Abril 2007	Centro de Microbiología Médica	TUCUMAN	orina sin sonda	<i>qnrE1</i>
Q1187	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Sanatorio Mitre	CABA	sangre	<i>aac(6')-lb-cr5</i>
Q1211	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Rawson	SAN JUAN	piel y partes blandas	<i>qnrB2</i>
Q2108	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Dr. Cosme Argerich	CABA	orina con sonda	<i>qnrB19</i>
Q3039	<i>E. cloacae</i>	Abril 2007	Dr. Juan A. Fernández	CABA	piel y partes blandas	<i>aac(6')-lb-cr7</i>

Resultados Objetivo II - Perfil plasmídico por endonucleasa S1

Q3094	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Dr. Cosme Argerich	CABA	piel y partes blandas	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>
Q3108	<i>K. oxytoca</i>	Abril 2007	Ángel C. Padilla	TUCUMAN	líq. peritoneal	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>
Q4016	<i>K. pneumoniae</i>	Abril 2007	Marcial Quiroga	SAN JUAN	orina sin sonda	<i>qnrB2</i>
Q4020	<i>K. oxytoca</i>	Abril 2007	Sor María Ludovica	LA PLATA, GBA	orina sin sonda	<i>qnrB2</i>
Q4134	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Clin. Reina Fabiola	CORDOBA	N/C	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>
Q4143	<i>C. freundii</i>	Abril 2007	Cuatro de Junio	Roque Saenz Peña	orina con sonda	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>
Q4160	<i>E. coli</i>	Abril 2007	Lucio Molas	LA PAMPA	orina sin sonda	<i>oqxAB</i>
Q5005	<i>E. cloacae</i>	Abril 2007	Centenario (Rosario)	SANTA FE	orina sin sonda	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>
Q5029	<i>E. cloacae</i>	Septiembre 2008	Angela Llano	CORRIENTES	orina sin sonda	<i>qnrB10</i>
Q5099	<i>K. pneumoniae</i>	Noviembre 2008	Dr. Julio C. Perrando	CHACO	orina sin sonda	<i>qnrB10</i>

Sección 5.03 Perfil plasmídico por endonucleasa S1

Se comparó el perfil plasmídico de cada aislamiento clínico parental con el de su/s respectiva/s transconjugante/s utilizando la técnica de endonucleasa S1 que permite linealizar los plásmidos. Los pares cepa clínica (líneas en gris claro) con su respectivo transconjugante (líneas en blanco) se resumen en la Tabla 8. En gris oscuro se resaltan los tamaños estimados de los plásmidos presentes en ambos aislamientos (clínico/transconjugante).

Tabla 8. Perfiles plasmídicos de aislamientos clínicos parentales y de su/s respectiva/s transconjugante/s.

Cepa	Especie	Plásmidos (Kb)				
<i>Transconjugantes con un solo plásmido</i>						
M7916	<i>E. cloacae</i>	316	148			
TC-M23226	<i>E. coli</i> J53	320				
M7943	<i>K. variicola</i>	372	83			
TC-M23825	<i>E. coli</i> J53	369				
M9167	<i>K. pneumoniae</i>	156	144	78		
TC-M23740	<i>E. coli</i> J53			76		
M9257	<i>Kva</i>	248	115	102	81	42
TC-M21844	<i>E. coli</i> J53				81	
M9272	<i>M. morgani</i>	55	<20			
TC-M23153	<i>E. coli</i> J53	49				
M9306	<i>K. pneumoniae</i>	96	81			
TC-M23172	<i>E. coli</i> J53		80			
M9314	<i>K. pneumoniae</i>	182	59			
TC-M23667	<i>E. coli</i> J53		63			
M9518	<i>E. asburiae</i>	333	102	54		
TC-M23227	<i>E. coli</i> J53			54		

Resultados Objetivo II - Perfil plasmídico por endonucleasa S1

M9684	<i>S. macescens</i>	336	302				
TC-M23252	<i>E. coli</i> J53	330					
M9820	<i>E. coli</i>	*					
TC-M11894	<i>E. coli</i> J53	34					
M9863	<i>K. pneumoniae</i>	305	209	<20			
TC-M23404	<i>E. coli</i> J53	197					
M9902	<i>E. coli</i>	357	116				
TC-M9979	<i>E. coli</i> J53	119					
M9921	<i>E. kobei</i>	344	90	60			
TC-M23665	<i>E. coli</i> J53	342					
M9932	<i>K. pneumoniae</i>	215	109	88	53		
TC-M23090	<i>E. coli</i> J53				54		
M9966	<i>Salmonella</i>	340	175	113	84	42	<20
TC-M23152	<i>E. coli</i> J53	343				40	
M9992	<i>K. pneumoniae</i>	156	124	68	38		
TC-M23408	<i>E. coli</i> J53			69			
M11007	<i>K. oxytoca</i>	169	79				
TC-M23407	<i>E. coli</i> J53		75				
M11059	<i>E. coli</i>	65	32				
TC-M23539	<i>E. coli</i> J53		35				
M11085	<i>K. pneumoniae</i>	213	155	68	47		
TC-M23174	<i>E. coli</i> J53			66			
M21014	<i>K. pneumoniae</i>	250	168				
TC-M21217	<i>E. coli</i> J53		166				
M22246	<i>P. stuartii</i>	142					
TC-M22714	<i>E. coli</i> J53	135					
Q1130	<i>K. pneumoniae</i>	186					
TC-M15051	<i>E. coli</i> J53	186					
Q1187	<i>E. coli</i>	168	148	74	33	30	
TC-M23337	<i>E. coli</i> J53				35		
Q1211	<i>K. pneumoniae</i>	175	139	102	62		
TC-M23202	<i>E. coli</i> J53	166			61		
Q2108	<i>K. pneumoniae</i>	338	216	103			
TC-M23382	<i>E. coli</i> J53	339					
Q3039	<i>E. cloacae</i>	114					
TC-M23125	<i>E. coli</i> J53	115					
Q3094	<i>K. pneumoniae</i>	137	127	122	77	32	
TC-M23384	<i>E. coli</i> J53					33	
Q3108	<i>K. oxytoca</i>	193	178	43	<20		
TC-M23097	<i>E. coli</i> J53			41			

Resultados Objetivo II - Perfil plasmídico por endonucleasa S1

Q4016	<i>K. pneumoniae</i>	368	220	147	99	42		
TC-M23827	<i>E. coli</i> J53	363						
Q4020	<i>K. oxytoca</i>	229	110	58				
TC-M23381	<i>E. coli</i> J53			57				
Q4134	<i>E. coli</i>	114	50					
TC-M23338	<i>E. coli</i> J53		47					
Q4143	<i>C. freundii</i>	245	218	194	115	59	51	
TC-M11222	<i>E. coli</i> J53			195		57		
Q5005	<i>E. cloacae</i>	277	238	133	105	75	44	<20
TC-M23386	<i>E. coli</i> J53					66		
Q5029	<i>E. cloacae</i>	315	160	99	61			
TC-M23426	<i>E. coli</i> J53	316						

Aislamientos con dos transconjugantes

M9828	<i>K. pneumoniae</i>	224	133	67				
TC-M23438	<i>E. coli</i> J53		135					
TC-M23439	<i>E. coli</i> J53			69				
M17277	<i>K. quasipneumoniae</i>	>453	221	126	111			
TC-M25520	<i>E. coli</i> J53	>453						
TC-M25207	<i>E. coli</i> J53				111			

Transconjugantes con rearrreglos genéticos

M17464	<i>E. cloacae</i>		265	129				
TC-M25209	<i>E. coli</i> J53	392	264	125				
Q5099	<i>K. pneumoniae</i>			145	122	50		
TC-M23428	<i>E. coli</i> J53	373	176			49		

Aislamientos clínicos que no conjugaron

M21692	<i>E. cloacae</i>	148	105					
Q4160	<i>E. coli</i>	-						

La Tabla está organizada por grupos aislamiento clínico-transconjugante/s, ordenados por orden alfabético y numérico, de acuerdo al código de identificación de los aislamientos parentales. Cada grupo está separado por líneas indicándose el aislamiento parental en fondo gris, y la/s transconjugante/s correspondiente/s en fondo blanco. Los tamaños de plásmidos concordantes entre el aislamiento parental y la transconjugante correspondiente, se resaltan en negrita y con fondo gris oscuro. Al final de la Tabla se muestran los dos casos donde hubo posibles rearrreglos en la conjugación (se resaltan los resultados discordantes en naranja) y los dos aislamientos clínicos para los que no se obtuvieron transconjugantes. * Para el aislamiento M9820 no fue posible determinar el perfil plasmídico, ya que el ADN se degradaba en el proceso.

En 37 de las 40 transconjugantes, los tamaños de los plásmidos concordaron con los del aislamiento parental. Los tres casos restantes son los siguientes (Tabla 8):

a) En el aislamiento clínico *E. coli* M9820 no se pudo determinar el perfil plasmídico por S1, aunque el ensayo se repitió varias veces, observándose en todos los casos que el ADN estaba

degradado. Sin embargo, el tamaño del plásmido transferido a la TC-M11894 se pudo determinar sin problemas.

b) El aislamiento *K. pneumoniae* Q5099 y su TC-M23428 presentaron 3 plásmidos cada uno, sin embargo, solo uno estuvo presente en ambas cepas, 50Kb y 49Kb, respectivamente. El aislamiento TC-M23428 presentó dos plásmidos (373Kb y 176Kb) ausentes en la cepa parental.

c) El aislamiento *E. cloacae* M17464, mostró 2 bandas de 265 y 129 kb mientras que su transconjugante TC-M25209 mostró una tercera banda adicional de 392 kb.

Luego de reiterados ensayos de endonucleasa S1, se obtuvieron los mismos resultados mencionados en (b) y (c), lo cual sugiere que ocurrieron rearrreglos genéticos durante el proceso de conjugación. En ambos casos, las transconjugantes se excluyeron de la plasmoteca, y se reemplazaron por los aislamientos dadores para continuar con las etapas posteriores de caracterización molecular.

De las 37 transconjugantes cuyas bandas plasmídicas concordaron con las de los aislamientos parentales, se observó que hubo 3 casos, TC-M23152, TC-M23202 y TC-M11222 (correspondientes a los aislamientos clínicos M9966, Q1211 y Q4143, respectivamente), en los que se transfirieron dos plásmidos a cada transconjugante (Tabla 8).

Finalmente, se analizaron los perfiles plasmídicos de los aislamientos en los que no se pudieron obtener transconjugantes. Se determinó que *K. pneumoniae* M21692 contenía 2 plásmidos de 148 y 105 kb, pero para el aislamiento *E. coli* Q4160 (el único portador de *oqxAB*) no se observó ninguna banda, a pesar de haber repetido el ensayo (Tabla 8).

Sin considerar las dos transconjugantes en los que hubo posibles rearrreglos (TC-M25209 y TC-M23428), y las tres que contenían más de un plásmido (TC-M11222, TC-M23152 y TC-M23202), las 35 transconjugantes restantes, tuvieron una distribución de tamaños de plásmidos cuya mediana fue de 80 kb, con un rango de 33 a >450 kb. En un estudio realizado recientemente, se analizaron más de 4.600 secuencias de plásmidos obtenidos de PLSDb y 926 de estos pertenecían a Enterobacterales, con una mediana de 46 kb y un rango de tamaño de 1,2 a 793 kb.¹³ Cabe aclarar que el ensayo de endonucleasa S1 utilizado, tenía ese mismo rango de detección. Una característica propia de este ensayo, es que por debajo de 30 kb aproximadamente, la corrida electroforética ya no tiene buena resolución, con lo cual es posible que no se detecten plásmidos menores a 30kb.

Se analizó la dispersión de tamaños de plásmidos más en detalle, y se observó que, si bien el rango de tamaños fue muy amplio, 75% de los plásmidos tiene un tamaño menor a 190 kb.

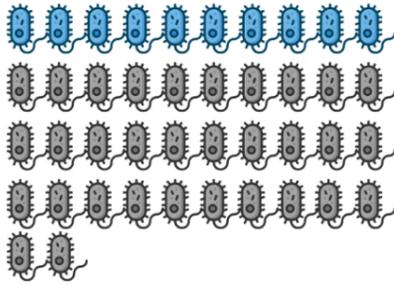
Sección 5.04 Secuenciación masiva de ADN

Para comenzar a caracterizar molecularmente los plásmidos incluidos en la plasmoteca (38 transconjugantes y cuatro aislamientos clínicos) se utilizaron en primera instancia las técnicas usadas rutinariamente en nuestro laboratorio, es decir extracción de ADN plasmídico con el kit indicado en Materiales y Métodos y secuenciación por la tecnología de Illumina. Esta metodología se aplicó a 10 transconjugantes, que contenían plásmidos en un rango de 34 a 369 kb. Las lecturas cortas obtenidas se ensamblaron *de novo* con Unicycler. Como se observa en la Figura 42, sólo en cuatro casos se obtuvieron secuencias cerradas (circulares) de 31.584, 64.387, 86.076 y 87.693 pb. Para los 6 casos restantes se obtuvieron contigs lineales. Las secuencias cortas de Illumina (250 bp) pueden constituir una limitación cuando los genomas contienen segmentos de ADN repetidos de mayor longitud que el tamaño de la lectura. Por esta razón, los ensambladores no pueden asignar qué copia de la repetición corresponde a la secuencia que se está ensamblando, reflejando una pérdida de continuidad y generando contigs. Esto representa una limitación en el análisis de plásmidos que poseen gran variedad de EGMs que contienen repeticiones (IS, transposones, integrones, etc) y/o que pueden estar en más de una copia. Por lo tanto, fue necesario implementar un método de secuenciación adicional.

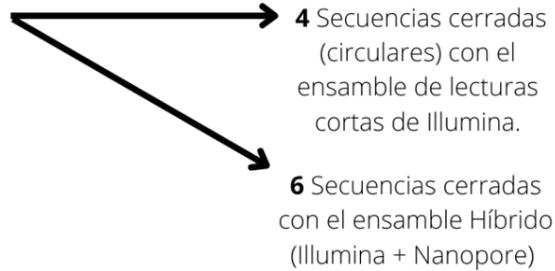
Se implementó una tecnología nueva de NGS para el laboratorio, ONT, que produce lecturas largas de más de 100 kb pero que tienen mayor tasa de error que Illumina. De esta manera, ONT permite realizar un ensamble híbrido, combinando esas lecturas largas con las cortas de Illumina. En el ensamble híbrido, la longitud de las lecturas largas es suficiente para leer a través de las repeticiones, eliminando el problema de falta de continuidad que tienen los ensambladores. Por otro lado, las lecturas cortas de Illumina permiten reducir el error.

Cabe aclarar que para la tecnología de ONT se debe hacer una extracción de ADN que mantenga la integridad física de la molécula en el mayor grado posible (para obtener lecturas de máxima longitud). Por esta razón, no se puede utilizar el mismo sistema de extracción de ADN empleado para Illumina, ni tampoco realizar una extracción específica para ADN plasmídico (se debe extraer ADN total). Para las 6 transconjugantes en las que no se obtuvieron secuencias cerradas de sus plásmidos utilizando solo secuenciación con Illumina, se realizó una segunda extracción de ADN, utilizando un kit específico que había demostrado ser el más conveniente para la secuenciación con ONT, en el grupo de trabajo del Dr. Melano (Laboratorios de Salud Pública de Ontario, Canadá). Con la implementación de ONT, y ensamble híbrido, se obtuvieron secuencias circulares para esas seis transconjugantes (Figura 42). Con este antecedente, en el resto de las 32 cepas de la plasmoteca, se realizaron extracciones de ADN total con el kit para ONT y se secuenciaron mediante ambas tecnologías. Como se muestra en la Tabla 9, para las 38 cepas secuenciadas por ONT, el rango de longitud máxima de lectura fue de 96.582 a 197.706 pb.

Plasmoteca n=42



Extracción de plásmidos



Illumina

4/42 Ensamble **de novo** sólo con Illumina resultaron en secuencias cerradas (circulares)

Illumina + Nanopore

38/42 Ensamble **Híbrido** de secuenciación por Illumina y Nanopore de los cuales:

- 6 ensambles realizados de extracciones de plásmidos resultaron secuencias cerradas (circulares)
- 32 extracciones de genoma completo (cromosoma y plásmidos)

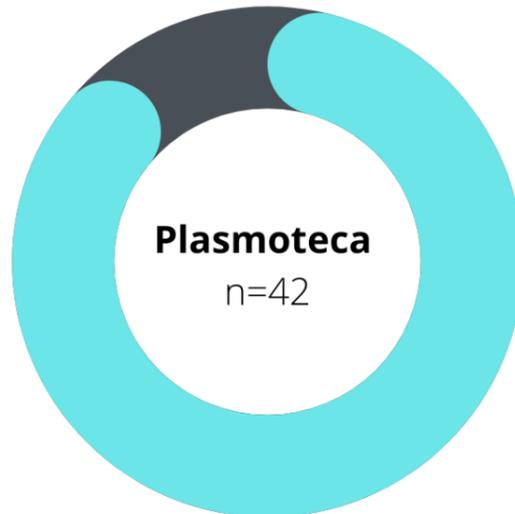


Figura 42. Secuenciación de las 42 cepas de la plasmoteca. La plasmoteca consistió en 38 transconjugantes y 4 aislamientos clínicos (n=42). Arriba se muestra que se realizó extracción de plásmidos para 10 cepas, de los cuales sólo 4 ensambles *de novo* de la secuenciación por Illumina dieron como resultado secuencias circulares cerradas. En los 6 casos restantes, fue necesario secuenciar mediante ONT para realizar un ensamble híbrido (Illumina + ONT). Finalmente, abajo se detalla que en 4/42 se obtuvieron secuencias circulares cerradas utilizando sólo Illumina, y en 38/42 restantes se hizo ensamble híbrido (Illumina + ONT) para obtener secuencias circulares cerradas. Cabe destacar, que dentro de los 38 casos en las cuales se realizó ensamble híbrido, en 6 cepas se utilizó el ADN obtenido en la extracción de plásmidos para la secuenciación por Illumina, mientras que en 32 cepas se extrajo el genoma completo (ADN cromosómico y plasmídico) para el mismo fin.

Tabla 9. Métricas de la secuenciación por ONT.

	Cantidad de bases secuenciadas	Cobertura	Cantidad de lecturas de ONT obtenidas	Lectura de ONT mayor	Lectura de ONT menor	Promedio del largo
Mínimo	109.816285	22	11.169	96.582	90	4.963
Máximo	2.299.621.097	386	230.250	197.706	129	16.550
Q1	359.727.268	75	38.732	110.495	100	7.930
Mediana	578.544.568	125	61.222	115.249	106	9.794
Q3	785.664.841	166	80.531	123.420	113	13.247
Promedio	664.977.398	133	67.375	120.984	107	10.400
IQR	425.937.573	90	41.800	12.925	13	5.318

Las lecturas obtenidas para cada una de las 38 secuenciaciones por ONT, se analizaron mediante el *script* Assembly-stats. Se describen en la tabla los valores mínimos, máximo mediana, promedio, cuartil 1 (Q1), mediana, cuartil 3 (Q3) y rango intercuartílico (IQR) para los valores obtenidos de las 38 secuenciaciones mediante la técnica ONT. Las variables analizadas consisten en: cantidad de bases secuenciadas, cobertura (calculada según largo total obtenido por secuenciación / tamaño estimado del genoma*), cantidad de lecturas de ONT obtenidas, promedio de largo de las lecturas, y en las lectura de ONT mayor del contig de mayor tamaño, y de menor tamaño. *Para *E. coli* J53 se utilizó el tamaño de 4.682.574 pb¹³⁹ sumado al estimado por endonucleasa S1 para los plásmidos, y para los aislamientos clínicos el valor de la cepa ATCC correspondiente.¹⁴⁰

Finalmente, con la combinación de la secuenciación de Illumina y ONT se realizó el ensamble híbrido, y se logró circularizar los plásmidos presentes en la totalidad de la plasmoteca.

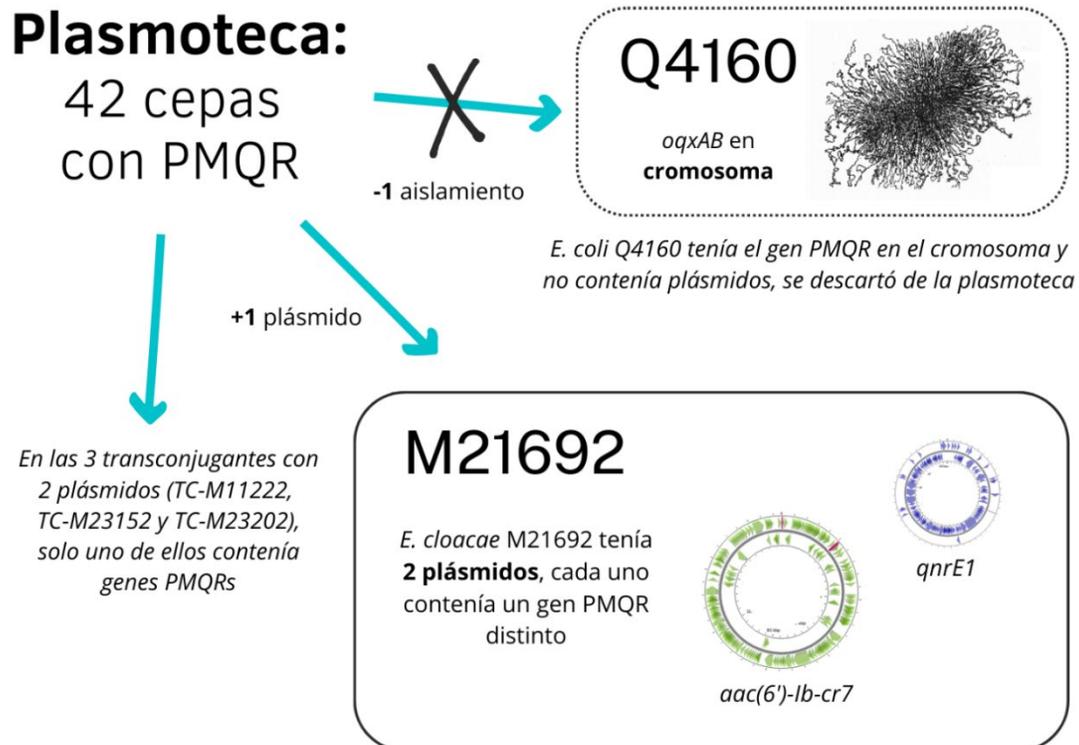
Sección 5.05 Análisis de plásmidos portadores de genes PMQR

(a) Identificación de los plásmidos portadores de genes PMQR

Para identificar genes de RAM se utilizaron las herramientas bioinformáticas AMRFinderPlus y ResFinder. Todos los ensamblajes cerrados se analizaron con estas herramientas y se pudo determinar aquellas moléculas correspondientes a plásmidos portadores de genes PMQR (Tabla 10). Aquellos plásmidos que no presentaron algún gen PMQR no se analizaron en detalle. Con la excepción del aislamiento clínico *E. coli* Q4160, todas estas secuencias circulares tenían tamaños acordes a lo esperado para un plásmido. En Q4160, *oqxAB* se localizó en una secuencia circular de 5,56 Mb, es decir el tamaño esperado para el cromosoma de *E. coli*. La posible localización cromosómica de *oqxAB* concordó con los resultados negativos obtenidos en los ensayos de conjugación, así como con la ausencia de bandas plasmídicas en el ensayo de endonucleasa S1. Por esta razón Q4160 se eliminó de la plasmoteca, aunque el análisis bioinformático se realizó de igual manera (sección 5.06 - a). Por otra parte, el análisis del aislamiento clínico *K. pneumoniae* M21692 demostró la presencia de dos plásmidos, cada uno de los cuales contenía un gen PMQR distinto (*qnrE1* y *aac(6')-Ib-cr*), por lo cual se agregó un plásmido más a la plasmoteca. Por lo tanto, la plasmoteca se construyó con 42 plásmidos portadores de genes PMQR (Figura 43 y Tabla 10).

Los plásmidos que contenían los genes PMQRs identificados en el análisis de genes RAM se nombraron con la letra “p” de plásmido, seguido por la especie del aislamiento clínico portador

y el código de identificación del mismo en el cepario de nuestro laboratorio, y por último el tamaño del plásmido en kilobases determinado por análisis de secuencia. Por ejemplo: el plásmido “pEco_M9902_127” proviene del aislamiento clínico *E. coli* M9902 y tiene un tamaño de 127 kb (ver Tabla 10). Los plásmidos que se habían nombrado previamente como p17277B_123, p17277A_477 y pKp1130³⁶, se renombraron en esta tesis como pKqsq_M17277_123, pKqsq_M17277_477 y pKpn_Q1130_193 respectivamente.



Finalmente, la plasmoteca incluyó 41 cepas y **42 plásmidos portadores de PMQRs.**

Figura 43. Composición final de la plasmoteca luego de establecer la localización de cada gen. La plasmoteca inició con 42 cepas con PMQRs, pero sufrió modificaciones con los resultados obtenidos por secuenciación: el aislamiento *E. coli* Q4160 contenía el gen *oqxAB* en el cromosoma, por lo que se descartó de la plasmoteca; el aislamiento clínico *E. cloacae* contenía dos PMQRs en plásmidos diferentes, por lo que sumó un plásmido a la plasmoteca; y por último ninguna de las tres transconjugantes que contenían dos plásmidos contenía más de un PMQR. Con estas modificaciones, la plasmoteca finalmente consistió en 41 cepas y 42 plásmidos portadores de PMQRs.

Tabla 10. Identificación y denominación de los plásmidos obtenidos por NGS.

Aislamientos Clínicos							
Cepa	Especie	Transconjugante	Ensamble	Tamaño estimado por S1 (KB)	Tamaño por NGS (pb)	Genes PMQRs	Denominación del plásmido portador de PMQR
M7916	<i>E. cloacae</i>	TC-M23226	Hibrido	320	325.547	<i>qnrB10</i>	pEcl_M7916_325
M7943	<i>K. variicola</i>	TC-M23825	Hibrido	372	60.263	<i>qnrB10 aac(6')-Ib-cr5</i>	pKva_M7943_60
M9167	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23740	Illumina	76	86.076	<i>qnrS1</i>	pKpn_M9167_86
M9257	<i>K. variicola</i>	TC-M21844	Hibrido	81	90.347	<i>qnrE1</i>	pKva_M9257_90
M9272	<i>Mmo</i>	TC-M23153	Hibrido	49	46.408	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pMmo_M9272_46
M9306	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23172	Hibrido	80	90.069	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_M9306_90
M9314	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23667	Hibrido	63	63.400	<i>qnrB10 aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_M9314_63
M9518	<i>E. asburiae</i>	TC-M23227	Hibrido	54	55.248	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pEae_M9518_55
M9684	<i>S. marcescens</i>	TC-M23252	Hibrido	330	342.804	<i>qnrB10 aac(6')-Ib-cr7</i>	pSma_M9684_342
M9820	<i>E. coli</i>	TC-M11894	Hibrido	34	36.539	<i>qnrB19</i>	pEco_M9820_36
M9828	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23439	Hibrido	69	71.868	<i>qnrB10</i>	pKpn_M9828_71
M9828	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23438	Hibrido	135	138.475	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_M9828_138
M9863	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23404	Hibrido	197	183.544	<i>qnrB1 aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_M9863_197
M9902	<i>E. coli</i>	TC-M9979	Hibrido	119	127.921	<i>qnrB2 aac(6')-Ib-cr5</i>	pEco_M9902_127
M9921	<i>E. kobei</i>	TC-M23665	Hibrido	342	354.216	<i>qnrB10 aac(6')-Ib-cr7</i>	pEko_M9921_354
M9932	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23090	Hibrido	54	55.550	<i>qnrS1 aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_M9932_55
M9966	<i>Salmonella</i>	TC-M23152	Hibrido	343	359.603	<i>qnrB2</i>	pSal_M9966_359
				40	40.027		-
M9992	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23408	Hibrido	69	73.281	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	pKpn_M9992_73
M11007	<i>K. oxytoca</i>	TC-M23407	Illumina	75	87.693	<i>qnrS1</i>	pKox_M11007_87
M11059	<i>E. coli</i>	TC-M23539	Illumina	35	31.584	<i>qnrB19</i>	pEco_M11059_31
M11085	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23174	Illumina	66	64.387	<i>qnrB10</i>	pKpn_M11085_64
M17277	<i>K. quasipneumoniae</i>	TC-M25207	Hibrido	111	123.307	<i>qnrB52 aac(6')-Ib-cr5</i>	pKqsq_M17277_123
		TC-M25520	Hibrido	>453	477.340	<i>qnrB4</i>	pKqsq_M17277_477
M17464	<i>E. cloacae</i>	Se eliminó**	Hibrido	265	274.469	<i>qnrA1</i>	pEcl_M17464_274
		-		138	138.989		-

Resultados Objetivo II - Análisis de plásmidos portadores de genes PMQR

M21014	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M21217	Hibrido	166	175.492	<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpnM21014_175
M21692	<i>K. pneumoniae</i>	No conjugó*	Hibrido	105	102.193	<i>qnrE1</i>		pKpn_M21692_102
		No conjugó *	Hibrido	148	150.550		<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	pKpn_M21692_150
M22246	<i>P. stuartii</i>	TC-M22714	Hibrido	135	146.393	<i>qnrB1</i>		pPst_M22246_146
Q1130	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M15051	Hibrido	186	193.854	<i>qnrE1</i>		pKpn_Q1130_193
Q1187	<i>E. coli</i>	TC-M23337	Hibrido	35	50.078		<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pEco_Q1187_50
				166	174.963	<i>qnrB2</i>		pKpn_Q1211_174
Q1211	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23202	Hibrido	61	67.931			-
Q2108	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23382	Hibrido	339	343.372	<i>qnrB19</i>		pKpn_Q2108_343
				115	124.864			-
Q3039	<i>E. cloacae</i>	TC-M23125	Hibrido	-	36.531		<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	pEcl_Q3039_36
Q3094	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23384	Hibrido	33	56.682		<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pKpn_Q3094_56
Q3108	<i>K. oxytoca</i>	TC-M23097	Hibrido	41	43.268		<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pKox_Q3108_43
Q4016	<i>K. pneumoniae</i>	TC-M23827	Hibrido	363	381.943	<i>qnrB2</i>		pKpn_Q4016_381
Q4020	<i>K. oxytoca</i>	TC-M23381	Hibrido	57	53.237	<i>qnrB2</i>		pKox_Q4020_53
Q4134	<i>E. coli</i>	TC-M23338	Hibrido	47	62.305		<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	pEco_Q4134_62
				57	61.205	<i>qnrB10</i>	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	pCfr_Q4143_61
Q4143	<i>C. freundii</i>	TC-M11222	Hibrido	195	200.887			-
Q5005	<i>E. cloacae</i>	TC-M23386	Hibrido	66	55.183		<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	pEcl_Q5005_56
Q5029	<i>E. cloacae</i>	TC-M23426	Hibrido	316	328.541	<i>qnrB10</i>		pEcl_Q5029_328
		-		144	150.868			-
Q5099	<i>K. pneumoniae</i>	Se eliminó**	Hibrido	122	132.807	<i>qnrB10</i>		pKpn_Q5099_132
		-		50	54.145			-

Las secuencias de los plásmidos portadores de genes PMQRs se obtuvieron por NGS de las transconjugantes correspondientes, a menos que se especifique lo contrario. En color naranja se resaltan los resultados obtenidos por NGS que no concordaron con los estimados por endonucleasa S1, y en color gris, los plásmidos que se descartaron por no poseer genes de PMQRs. *El aislamiento clínico no conjugó; la secuencia del plásmido portador de PMQRs se obtuvo por NGS de dicho aislamiento. **La transconjugante obtenida se eliminó por posibles rearrreglos genómicos ocurridos luego de la conjugación; la secuencia del plásmido portador de PMQRs se obtuvo por NGS del aislamiento clínico parental.

Mediante comparación de los tamaños de los plásmidos portadores de genes PMQRs estimados por endonucleasa S1 y los obtenidos por NGS, se observaron dos discrepancias (Tabla 10 resultados resaltados en naranja). En primer lugar, si bien en el análisis por endonucleasa S1 el aislamiento clínico Q3039 y su TC-M23125 tenían una sola banda de aproximadamente 114 kb y 115 kb, respectivamente, en la secuenciación de esta última cepa se obtuvieron dos contigs

circulares de 124.864 y 36.531 pb, además del cromosoma circular. Además, en una segunda transconjugante de Q3039, denominada TC-M23126, no se habían observado bandas en el ensayo de endonucleasa S1, a pesar de haber pasado las pruebas fenotípicas y genotípicas de la conjugación [antibiograma y PCR positiva para *aac(6')-Ib-cr*]. Por esta última razón, TC-M23126 se había descartado y se secuenció TC-M23125. La explicación más plausible de esta discrepancia se fundamenta en que el plásmido de aproximadamente 36 kb portador de *aac(6')-Ib-cr* no se pudo visualizar en los ensayos de endonucleasa S1 del aislamiento parental Q3039, ni en los de sus dos transconjugantes, debido a que su tamaño está en el límite de detección de dicho ensayo (30 kb).

Una segunda discrepancia se observó comparando los resultados de endonucleasa S1 de TC-M23825 con los obtenidos por secuenciación. Si bien los resultados de endonucleasa S1 coincidían para el aislamiento dador M7943 (372 kb) y su transconjugante TC-M23825 (369 kb), el contig circular obtenido por secuenciación de este último, tuvo un tamaño mucho menor (60.263 pb). Esta discrepancia sugirió que el aislamiento podría haber sufrido rearrreglos genómicos.¹⁴¹ Esta hipótesis se confirmó por estudios que se mencionan en la sección 5.07 – d de esta tesis.

Si bien se observaron estas discrepancias, se realizó un análisis de correlación entre los tamaños de los plásmidos portadores de genes PMQRs estimados por endonucleasa S1 vs. obtenidos por NGS. Se observó una muy buena correlación lineal con coeficiente de Pearson $r=0,92$ ($p=4,8 \times 10^{-17}$), y un $r^2=0,84$ (Figura 44). Sólo se observó un caso con gran discordancia entre el tamaño estimado por endonucleasa S1 y el obtenido por NGS, que correspondió a la TC-M23825 mencionado anteriormente (Figura 44, círculo rosa).

Considerando la buena correlación entre ambas variables, se puede observar que el ensayo por endonucleasa S1 subestima los tamaños de los plásmidos. Además, se observó menor correlación en los extremos del rango de tamaño de los plásmidos analizados, debido a que estos extremos se aproximan a los límites de resolución. Por ejemplo, los cuatro plásmidos de menor tamaño según lo estimado por endonucleasa S1 estuvieron en el rango 33-35 kb, pero correspondieron a tamaños de 32-57 kb obtenidos por secuenciación (Figura 44).

Con estos resultados se puede concluir que la técnica de endonucleasa S1 resultó muy buena estimadora del tamaño de los plásmidos, considerando los parámetros de corrida de PFGE utilizados en este trabajo, y dentro de los límites de resolución de esta metodología.

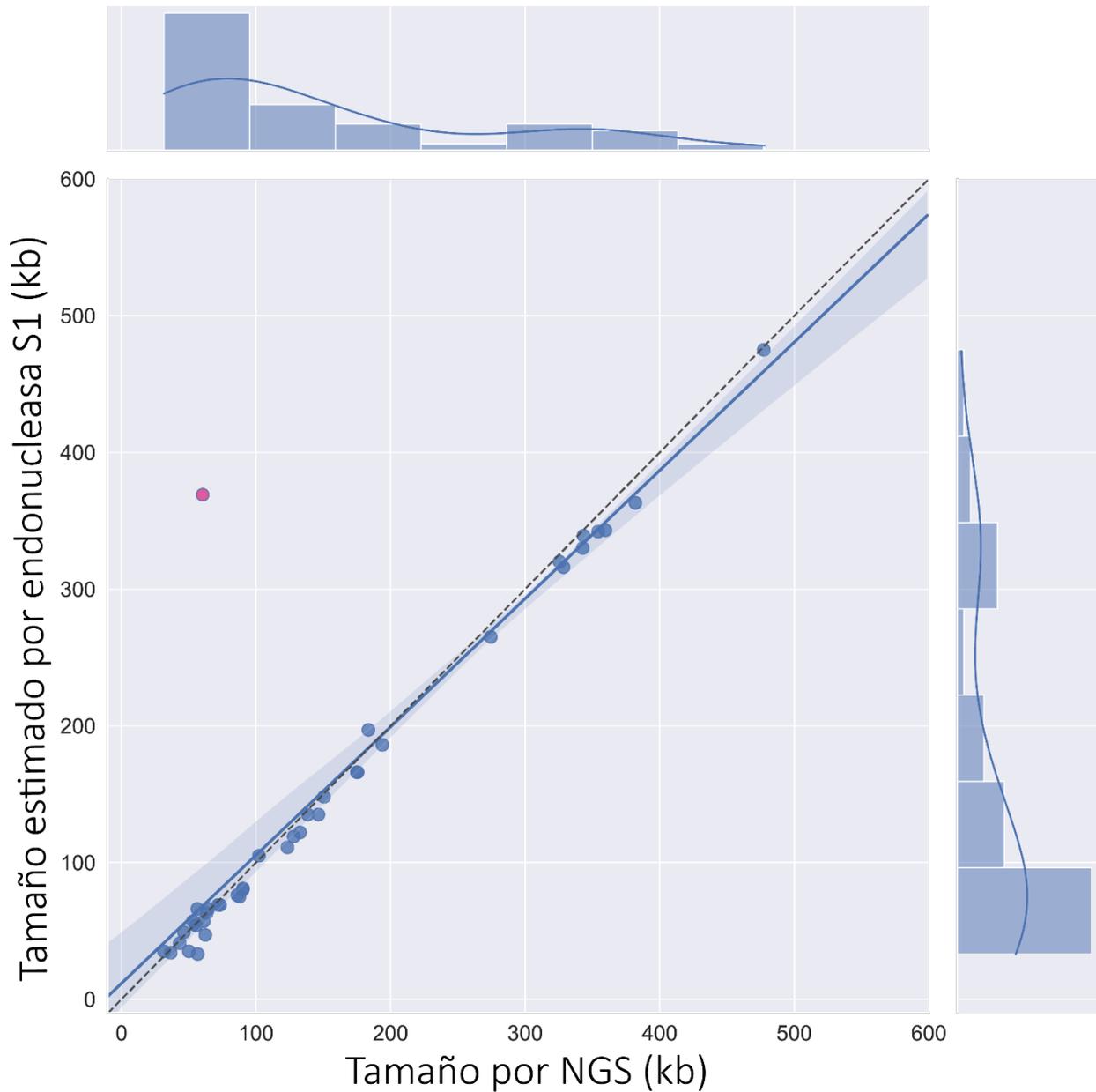


Figura 44. Correlación lineal entre el tamaño de plásmido estimado por endonucleasa S1 y el obtenido por NGS (n=41). Sólo se consideraron los plásmidos portadores de PMQRs y se excluyó pEcl_Q3039_36 ya que el valor de S1 no se pudo asignar (ver sección 5.05 - a). La línea obtenida por regresión lineal simple se indica como una línea azul continua, y la zona sombreada en celeste, muestra el IC95 de su pendiente. El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.92 ($p=4.8 \times 10^{-17}$). La línea de puntos indica la recta de correlación perfecta. El círculo rosa indica el único caso con mala correlación entre ambas técnicas. En el margen superior y derecho del gráfico se muestran los histogramas marginales, mostrando una tendencia hacia la izquierda, y hacia abajo respectivamente, lo que demuestra que en la plasmoteca se observaron mayor cantidad de plásmidos en el rango de 0 - 200 kb.

(b) Coselección de genes PMQRs y otros genes de RAM

La selección de genes PMQRs, junto con otros genes de RAM es muy relevante para la salud pública, tanto desde el punto de vista clínico (multirresistencia, opciones de tratamiento), como epidemiológico (diseminación de genes de RAM). Una de las formas de evaluar la coselección de mecanismos de RAM es analizar los perfiles de sensibilidad a antibióticos en las transconjugantes obtenidas luego de la conjugación de los aislamientos clínicos en estudio. En esta tesis, se analizó la sensibilidad a antibióticos de las transconjugantes obtenidas (ver el anexo Tabla S1 y Figura S2). Sin embargo, esta estrategia no permitía analizar la coexistencia en un único plásmido, de genes PMQRs y de otros genes de RAM, para todos los plásmidos portadores de PMQRs incluidos en la plasmoteca. Esto se debe a que siete cepas además de los plásmidos con PMQRs contenían otros plásmidos sin genes PMQRs pero que podían contener otros genes de RAM. Por lo tanto, se decidió evaluar además la presencia de otros genes de RAM en cada uno de los plásmidos portadores de PMQRs incluidos en la plasmoteca. Para este fin, se identificaron todos los genes de RAM presentes en los 42 plásmidos portadores de PMQRs secuenciados, mediante AMRFinderPlus (Figura 45).

Todas las transconjugantes excepto TC-M23539, evidenciaron cotransferencia de genes de RAM junto al PMQR. El 81% (34/42) de los plásmidos contenían genes de resistencia a las sulfonamidas, esto se debe a que varios PMQRs están en integrones (se analiza más adelante), que contienen el gen *sul1* dentro de la estructura conservada (3'CS). El 78% (33/42) de los plásmidos portadores de PMQR, tuvieron además algún gen de resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Cabe destacar la detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), tipo *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{PER-2} y *bla*_{SHV-5}. En contraste, no se encontraron genes que codifiquen para carbapenemasas en ninguno de los plásmidos portadores de PMQRs.

En cuanto a los aminoglucósidos, se encontró un gran porcentaje de cotrasferencia, con un 64% (26/42) de plásmidos portadores de genes de resistencia para esta familia. Además, 11 de ellos con más de un gen de resistencia sobre aminoglucósidos. Se observó la particularidad que los genes *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* se identificaron en forma conjunta. Un 59% (25/42) de los plásmidos fueron portadores de genes de resistencia a los fenicoles, en especial *catA1* (9 plásmidos) y *catB3* (9 plásmidos). Se identificaron un 43% (18/42) de plásmidos con cotransferencia de genes de resistencia para las tetraciclinas, siendo el más abundante el gen *tet(A)*, identificado en 12 plásmidos. El 52% (22/42) de los plásmidos contenían genes de resistencia las trimetoprimas, siendo *dfrA14* exclusivamente asociado a los genes *qnrB2*. En el 24% (10/42) se encontraron genes de resistencia para rifamicinas: 1 gen *arr* y 9 genes de *arr-3*. Se identificaron 21% (9/42) de plásmidos portadores de genes de RAM para la familia de los macrólidos. Se observó la particularidad de que los 5 plásmidos de la plasmoteca portadores del gen *ere(A)*, contenían además *qnrB10*.

Sólo dos de los 42 plásmidos (pEcl_M17464_274 y pKqsq_M17277_477) de la plasmoteca contenían genes de resistencia a colistina, específicamente *mcr-9*. Sin embargo, cabe aclarar que este gen no confiere resistencia a colistina *per se*, ya que la expresión que genera el fenotipo de resistencia a colistin parece depender de la presencia de dos genes adicionales *qseC* y *qseB*, que se localizan adyacentemente a *mcr-9*.^{142, 143} Un solo plásmido (pKqsq_M17277_123) estaba asociado al gen *bleO* que confiere resistencia a la bleomicina.

Finalmente, este análisis permitió determinar que el 90% de los plásmidos estudiados fueron MDR, es decir portadores de genes de RAM para 3 o más familias de antibióticos. Estos resultados indican que la cotransferencia de PMQRs con otros genes RAM es muy frecuente en este grupo de plásmidos portadores de PMQRs, lo cual tiene un alto impacto en la salud pública.

Figura 45. Genes de RAM detectados en los plásmidos portadores de genes PMQRs. En celeste se marcan los genes que están presentes en cada plásmido. En rosa se resaltan los plásmidos que se consideraron MDR, por contener genes de RAM para al menos tres antibióticos de diferentes familias. *Sul= sulfonamidas; Rif: Rifamicinas.

(c) Tipificación de plásmidos

Mediante el análisis bioinformático se identificaron los grupos a los que pertenecen cada uno de los 42 plásmidos portadores de PMQRs, observándose una gran diversidad de replicones. En total, se identificaron 18 replicasas diferentes, pertenecientes a 10 grupos de plásmidos: C, F, HI, I, M, N, R, U, X, y pKPC-CAV1193 (Figura 46). Estos plásmidos tuvieron replicones de un único grupo (36/42), o de grupos combinados (5/42), los cuales se denominaron plásmidos “híbridos”, mientras que el plásmido pMmo_M9272_46 no se pudo tipificar. El 67% (28/42) de los plásmidos de la plasmoteca pertenecieron a sólo tres grupos: N, F y HI. De estos tres, el más abundante fue el grupo N, con un 29% (12/42) de los plásmidos estudiados. Además, este grupo tuvo los plásmidos de menor tamaño, con un promedio de 57,6 kb y un rango de 43,2 - 71,8 kb, en concordancia con lo descrito en la bibliografía.^{14, 34}

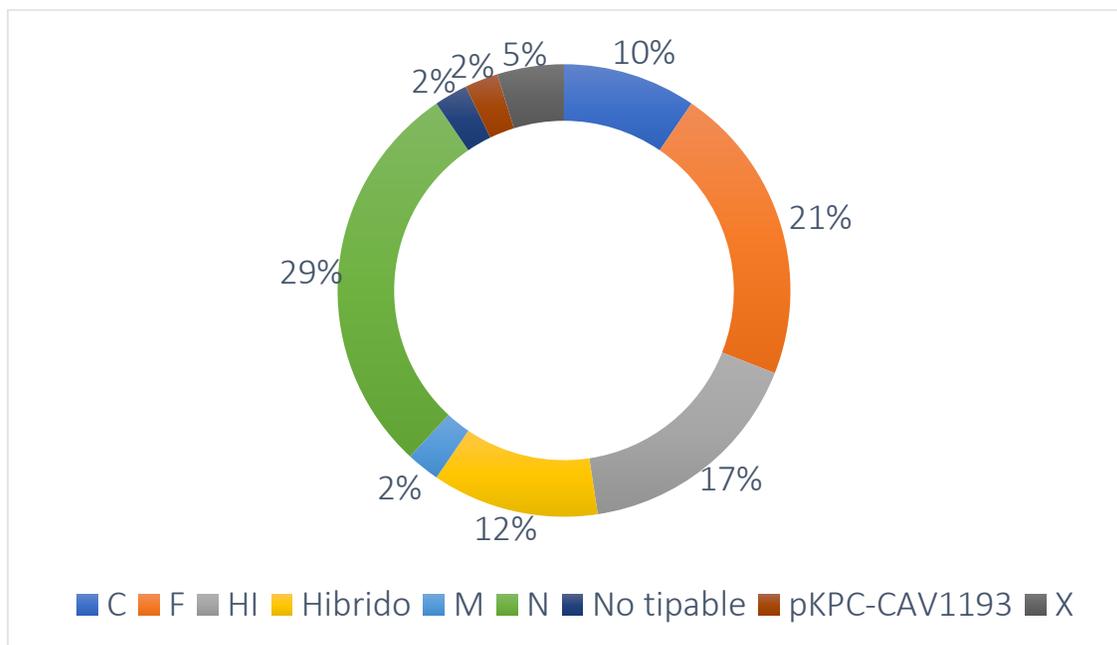


Figura 46. Distribución de grupos de plásmidos de la plasmoteca. Los plásmidos que contenían más de una replicasa perteneciente a diferentes grupos se denominaron híbridos.

El segundo grupo más abundante de la plasmoteca fue el F, con una proporción del 21% (9/42). El tamaño promedio de estos plásmidos fue de 126 kb, con un rango de 86 - 193 kb, intermedio a los rangos de los otros dos grupos más abundantes, N y HI (Figura 47). Dentro del grupo F se evidenció la alta diversidad de replicones F: dos FII, dos FII(pCRY)-like (81% de identidad), un FII(K) y un FII(pSFO)-like (84% de identidad), y finalmente, tres plásmidos con doble replicón: FIB(K) y FII(K).

El tercer grupo de plásmidos más abundante fue el HI, con 17% (7/42). Los plásmidos de este grupo fueron los de mayor tamaño de la plasmoteca, con un promedio de 350 kb y un rango de 274 - 477 kb (Figura 47). Todos los plásmidos de este grupo tuvieron replicones compuestos por HI2 y HI2A, excepto uno que contenía un replicon HI3 (Tabla 2).

Además de estos tres grupos más abundantes, se encontraron cuatro plásmidos del grupo C, con un promedio de tamaño de 151 kb y un rango de 132-175 kb, similar al rango de tamaño observado para los plásmidos del grupo F.¹⁴ Dos plásmidos del grupo X2 (2/42), con tamaños de 31 y 36 kb (los más pequeños de la plasmoteca), acorde a lo descrito en la bibliografía. Ambos demostraron tener fagos incompletos en su secuencia, conforme a la teoría de que la adquisición de estos plásmidos en algunas especies podría ser mediado por estos EGMs¹⁴. Sólo se encontró un único plásmido del grupo M1 (73 kb), y otro (36 kb) tipificado con el mismo replicón del plásmido pKPC-CAV1193 (49 kb), pero que no contenía los genes codificantes de carbapenemasas detectados en este último.

Los 6 plásmidos restantes de la plasmoteca mostraron particularidades en el análisis de tipificación. Aparte de los replicones dobles comúnmente observados tanto en el grupo F, con la combinación FIB(K)/FII(K), como en el grupo HI con las combinaciones HI2/HI2A y FIB/HI1B(pNDM-Mar), se hallaron cinco plásmidos con más de un replicón. Como se mencionó anteriormente, estos plásmidos se consideraron híbridos porque contenían replicones de diferentes grupos, y tuvieron un rango de tamaño (62 a 381 kb) mucho más amplio que los plásmidos con replicones de un solo grupo, cuyos tamaños fueron mucho más acotados (ver Figura 47). Los 5 plásmidos híbridos fueron los siguientes:

a) El plásmido pEco_M9902_127 de 127 kb, que contenía una combinación de dos de los tres grupos mayoritarios encontrados en la plasmoteca: N y FII.

b) Dos plásmidos que contenían combinaciones con dos grupos no encontrados en forma individual en los plásmidos mencionados hasta aquí: pEco_Q4134_62 con los replicones N y U (62 kb), y pKpn_M9828_138 con FII y R (138 kb).

c) Como “no hay dos sin tres”, también se encontraron dos plásmidos con tres replicones cada uno: pSal_M9966_359 con los replicones HI2/HI2A e Iy (359 kb), y pKpnQ4016_381 con FIB(K)/FII(K) y C (381 kb).

Finalmente, sólo uno de los 42 plásmidos de la colección (46 kb) no pudo tipificarse con las replicasas incluidas en la base de datos de Plasmid Finder.

Los resultados resumidos en la Figura 47 indican que los plásmidos portadores de genes PMQRs circulantes en Argentina tienen tamaños muy variables y una gran diversidad de replicones, lo cual sugiere fuertemente un alto potencial de diseminación horizontal. Además, no se observó ninguna asociación entre grupos de plásmidos y los tipos de genes PMQRs codificados

(d) Secuencias de Inserción

Se analizó mediante búsqueda en ISFinder la cantidad total de ISs encontradas en cada plásmido (Figura 48), a qué familias pertenecían y cuántas copias de las ISs de cada familia se encontraron por plásmido (Figura 49). En las figuras se puede observar que los plásmidos presentaron al menos una copia de una IS y un máximo de hasta 57 ISs en un solo plásmido. En cuanto al porcentaje de ISs respecto al tamaño total de cada plásmido tuvo un rango de 0,3% hasta 29% de IS (pb IS/pb plásmido x 100%), con una mediana de 9%. Los valores de densidad de IS variaron desde un mínimo de 0.95 hasta un máximo de 17 IS/10⁵ pb, y una mediana de 9 (Figura 47). Se observó cierta tendencia a tener mayor densidad de IS en los plásmidos mayores a 100 kb (Figura 47), lo cual podría explicarse por una mayor capacidad para alojar ISs en dichos plásmidos.

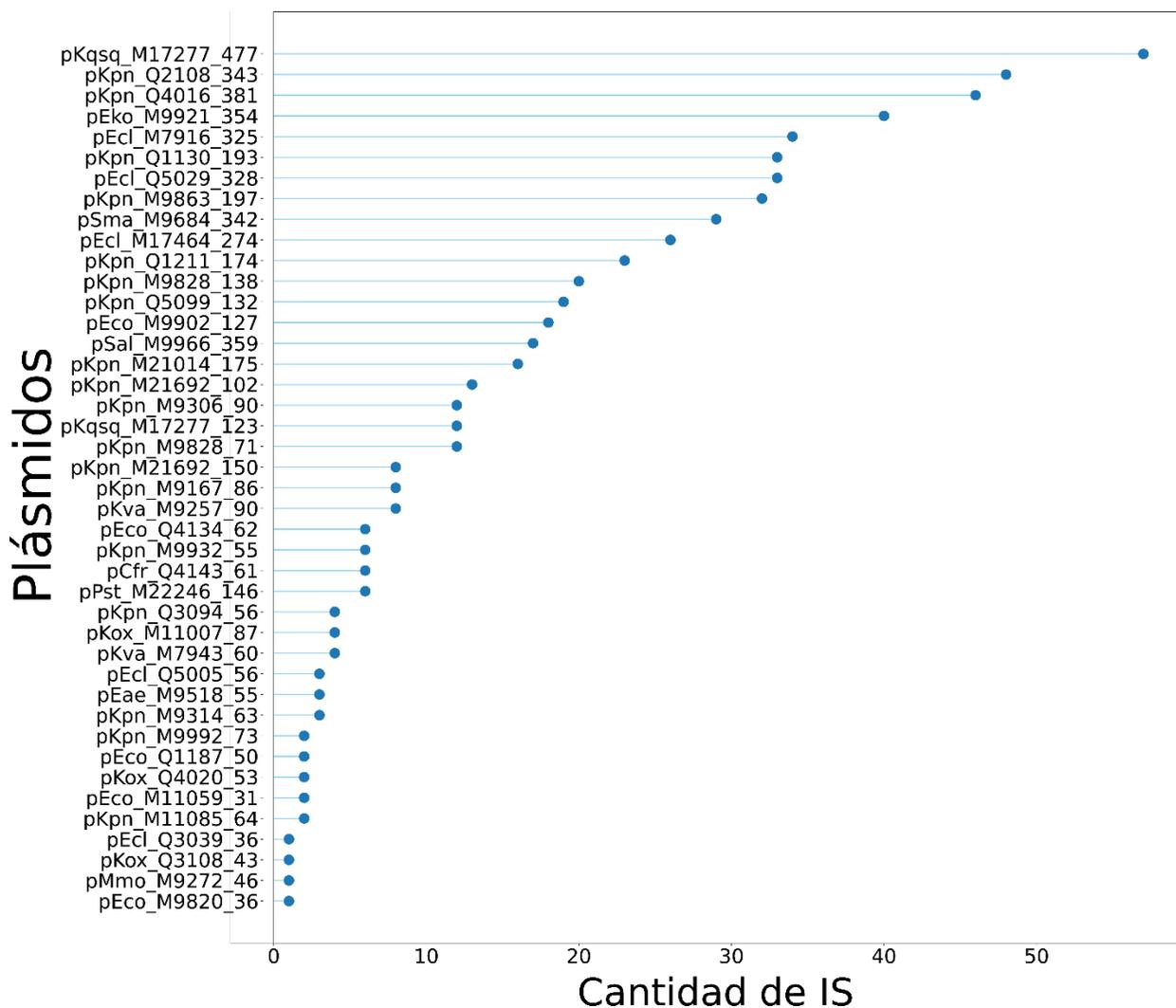


Figura 48. Cantidad de ISs encontradas en cada plásmido portador de PMQRs. El contenido de ISs varió desde 1 a 57 por plásmido.

Se identificaron las familias de IS encontradas en los plásmidos, y se analizó la abundancia de cada una. Se encontró que la familia IS26 es la mayoritaria en los plásmidos, y además con un alto número de copias por plásmido (Figura 49). Según este análisis las familias IS26 e IS-familia_Tn3 fueron las que tuvieron mayor copia por plásmido. En el análisis de porcentaje de plásmidos que poseen más de dos copias por familia, se encontró que las familias son: IS26, IS-familia_Tn3, IS1 e IS5. Estos resultados muestran que la familia de IS26 está ampliamente distribuida en los plásmidos portadores de PMQRs, y que además contienen copias múltiples por plásmido.

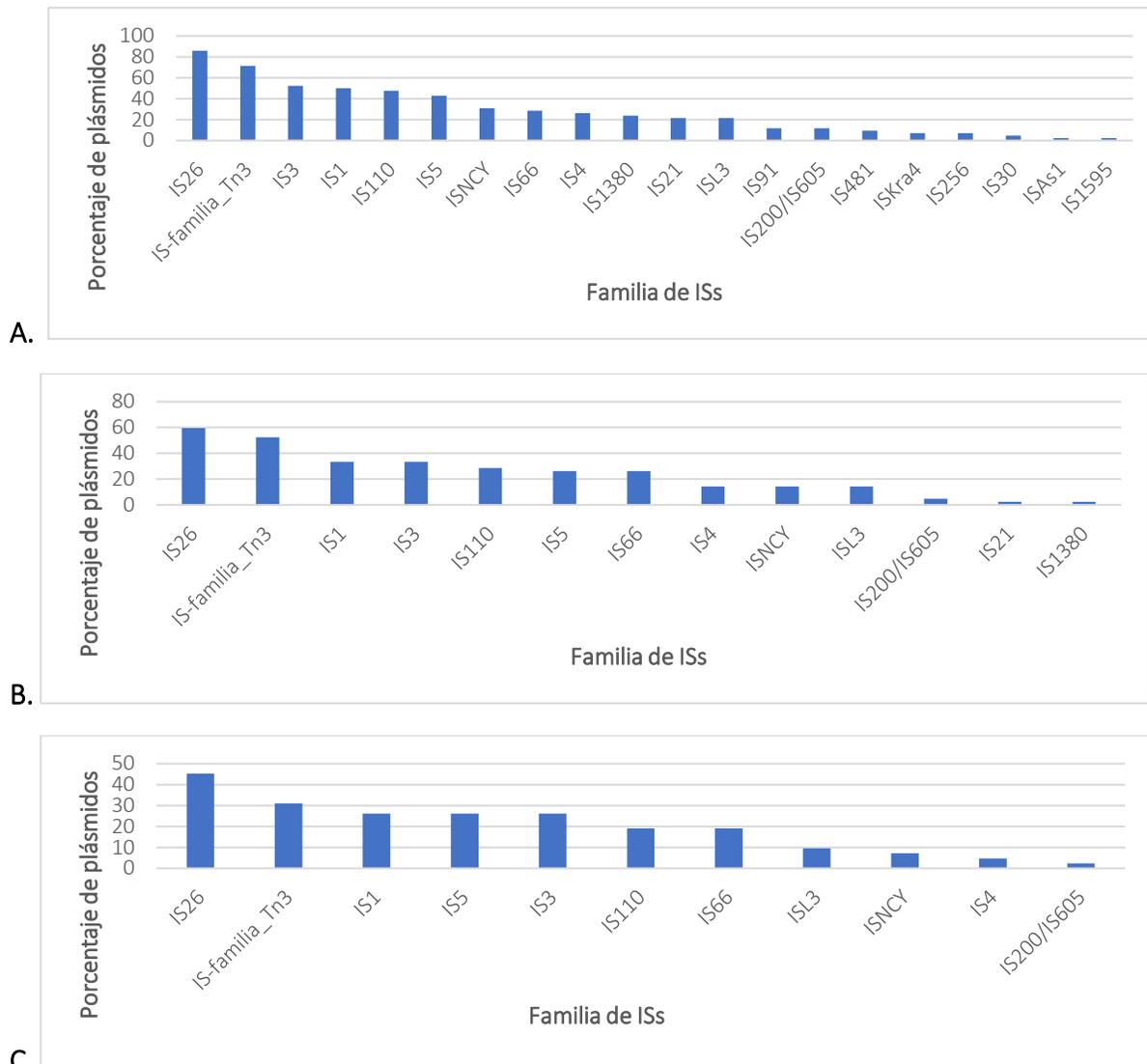


Figura 49. Ocurrencia de familias de ISs en la plasmoteca. A. Porcentaje de plásmidos portadores de las diferentes familias de ISs, ordenadas de mayor a menor. B. Porcentaje de plásmidos portadores de al menos dos copias de una misma familia de ISs por plásmido C. Porcentaje de plásmidos portadores de al menos tres copias de una misma familia de ISs por plásmido. La familia IS26 (anteriormente denominada IS6), incluye IS26 y otros miembros.

(e) Secuencias de inserción y transposones de la familia Tn3

Se analizó sólo la presencia de transposones de la familia Tn3 incluyendo el Tn1331 y Tn6238, ya que las ISs denominadas “IS-familia_Tn3” fueron mencionadas en el apartado previo. Se encontraron en el 45% (19/42) de los plásmidos secuencias altamente relacionadas con el Tn3 o con remanentes del mismo. La presencia de los elementos derivados del Tn3 tiene gran relevancia por su coselección de resistencia a la ampicilina, por la presencia de TEM-1 y de otros genes RAM que pueden portar. Además, el 17% (7/42) contenía transposones completos, 21% (9/42) con transposones parciales y 19% (8/42) sólo remanentes de transposones. Dentro de los transposones encontrados, en pEcl_Q3039_36 se identificó un Tn6238 completo que no se describió en la NCBI-BD. Se analizarán las estructuras del Tn6238 en profundidad en la sección 5.06 - j - 1.

(f) Integrones

La presencia de integrones se determinó con IntegronFinder, y se confirmó con la búsqueda manual. En el 33% (14/42) de los plásmidos de la plasmoteca, se detectaron ICC1 completos, mientras que en un 11% (11/42) se encontraron ICC1 con una sola copia de ISCR1. Un 7% (3/42) tuvieron ICC1, con dos copias de ISCR1 dentro del mismo integrón, por lo cual se los denominó “twin”. El 19% (8/42) de los plásmidos tuvieron ICC1 incompletos, es decir con deleciones en las regiones 5'CS, 3'CS o ISCR1. Finalmente, en el 36% (15/42) de los plásmidos no detectaron integrones. En ninguno de los 42 plásmidos analizados se detectaron estructuras tipo CALIN, es decir arreglos de casetes que no contienen el gen *intI1* de la integrasa.

La localización de los integrones pertenecientes a las diferentes clases mencionadas anteriormente se incluye en la 5.06.

(g) CRISPR

Mediante CRISPRFinder se analizaron los 42 plásmidos estudiados para evaluar la presencia de sistemas CRISPR-Cas. Sólo en uno de estos plásmidos, pKpn_Q2108_343, se detectó un arreglo CRISPR-Cas del tipo IV, con 21 espaciadores. Este plásmido contenía la combinación de replicones FIB y HI1B(pNDM-Mar), denominada HI3 en esta tesis, que resultó la más asociada a sistemas CRISPR-Cas según un estudio previo.^{29, 55} En pKpn_Q2108_343, el CRISPR-Cas tipo IV estuvo conformado por los genes *cas6e*, *dinG*, *cas* y un ORF de función desconocida y las 21 unidades repetidas localizadas río abajo de los anteriores (Figura 50). A su vez, este sistema CRISPR-Cas estaba flanqueado por IS1R y por ISKpn41, de modo tal que la estructura IS1R/CRISPR-Cas/ISKpn41 interrumpían el 3'CS2 de un ICC1 que contenía *bla*_{CTX-M2} en su *vr-2* (Figura 50). Este resultado sugiere que alguna de las dos ISs podría estar involucrada en la movilización del sistema CRISPR-Cas.

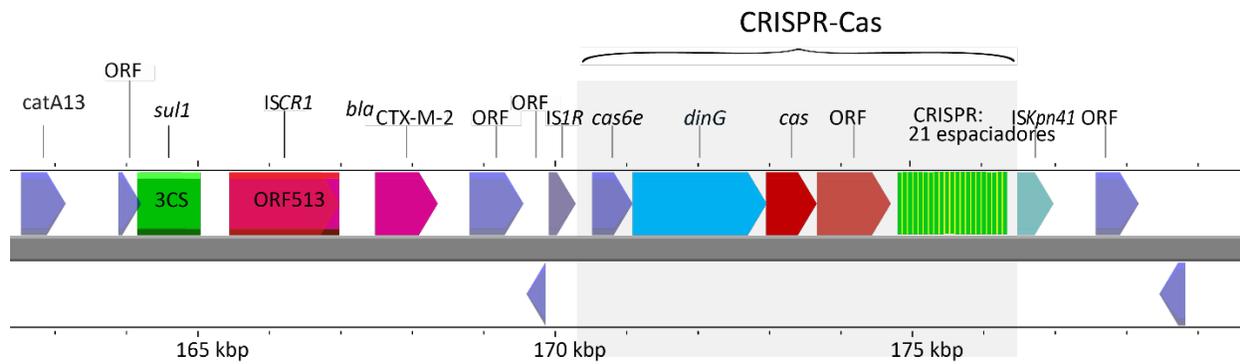


Figura 50. Arreglo CRISPR-Cas tipo IV detectado en el plásmido pKpn_Q2108_343. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada a este plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En fondo gris se resaltan los genes del arreglo CRISPR-Cas.

Sección 5.06 Análisis de los entornos genéticos de PMQRs y plásmidos portadores

En los siguientes apartados se exponen los resultados del análisis de los entornos genéticos de los diferentes genes PMQRs.

(a) *oqxAB*

En el aislamiento *E. coli* Q4160, no se logró transferir por conjugación los determinantes genéticos que otorgan el fenotipo característico de *oqxAB*. Tampoco se observó ningún plásmido por la técnica de endonucleasa S1, a pesar de los reiterados intentos realizados. Por esta razón, se secuenció directamente el aislamiento clínico, utilizando Illumina y ONT, y mediante ensamble híbrido se obtuvo un solo contig circular de 5.560.072 pb, que correspondió al cromosoma de *E. coli* Q4160. Si bien *oqxAB* se encontraban frecuentemente en el cromosoma de *K. pneumoniae*, en *E. coli* estos genes no se habían reportado en el cromosoma, sino que se los encontró siempre localizados en plásmidos, como pOLA52, el primer plásmido portador de *oqxAB* descrito en la bibliografía, y, por lo tanto, la primera evidencia de su diseminación horizontal.¹⁰⁸ Por lo tanto, primeramente se compararon las regiones flanqueantes de *oqxAB* en el aislamiento Q4160, con pOLA52 (Figura 51). En Q4160, se encontró que estos genes estaban inmediatamente flanqueados por dos copias de IS26, localizadas en el mismo sentido, y formando una estructura que mostró 99% de identidad y 100% de cobertura con el transposón Tn6010 (6.731 pb), localizado en pOLA52 y propuesto como el responsable de la movilización de *oqxAB* a este plásmido. Esta no fue la única región con alta identidad entre Q4160 y pOLA52, ya que río abajo de *oqxAB* en Q4160, se halló un fragmento también presente en pOLA52, que contenía *bleO* flanqueado por IS26 y los restos de un Tn3. Sin embargo, este fragmento estaba localizado adyacentemente al Tn6010 en pOLA52, mientras que en el cromosoma de Q4160 se encontró en

el extremo opuesto de este transposón, y en orientación contraria, posiblemente debido a un evento de inversión (ver Figura 51). La presencia de IS26 en los extremos de este fragmento sugiere que podría ser la responsable de su movilización.

Por otra parte, se encontraron diferencias entre el entorno de *oqxAB* en Q4160 y pOLA52. En primer lugar, el Tn6011, localizado en pOLA52, no se encontró en el cromosoma de Q4160. En segundo lugar, río abajo de *oqxAB* en Q4160, se encontraron los genes *aph(4)-Ia* y *aac(3)-IV*; el operón *mer* y otras regiones con alta identidad con Tn21; *mph(B)*, y un ICC1, con *aadA1* como casete, *bla_{CTX-M-2}* en la *vr-2*, y flanqueado por una IS26 en el extremo de *intl1*. Por lo tanto, se definió una región del cromosoma de Q4160, de 64.981 pb, que estaba flanqueada por dos copias de IS26 en orientaciones opuestas, y que contenía Tn6010 (con *oqxAB*) y todos los genes de RAM y EGMs mencionados (Figura 51). La comparación de esta región con NCBI-BD mostró que 94 de los 100 aciertos con mayor identidad correspondían a plásmidos de diversos tamaños y grupos, encontrados en distintas especies bacterianas. Cabe destacar que en la plasmoteca no se encontraron secuencias con identidad y cobertura relevante con esta región. Por otra parte, las dos regiones de 100.000 pb adyacentes a los extremos de la región de 64.981 pb flanqueada por IS26 (ver Figura 51), se compararon contra NCBI-BD, y en ambos casos, se encontró que los 100 aciertos de mayor score correspondieron a secuencias de cromosomas de *E. coli*.

En conjunto, estos resultados demostraron la localización cromosómica de *oqxAB* en Q4160, y también sugieren que la región de 64.981 pb flanqueada por IS26 que contiene estos genes fue adquirida de uno, o varios plásmidos, en particular, pOLA52 o alguno de sus relacionados. La presencia de las copias de IS26 en los extremos de esta región, donde se pierde la identidad con los cromosomas de *E. coli*, sugiere que esta IS fue responsable del evento genético que permitió la integración de dicha región en el cromosoma de Q4160.

Para descartar que estos resultados no sean producto de un artefacto de las herramientas bioinformáticas utilizadas, se realizó un mapeo de lecturas largas de ONT. Se utilizó el contig circular del cromosoma de Q4160 como referencia, y se observó que había suficiente cobertura y continuidad en las lecturas de ONT a cada lado de cada extremo de la región de 64.981 pb flanqueada por IS26, es decir, las 2 regiones donde se pierde la identidad con los cromosomas de *E. coli*.

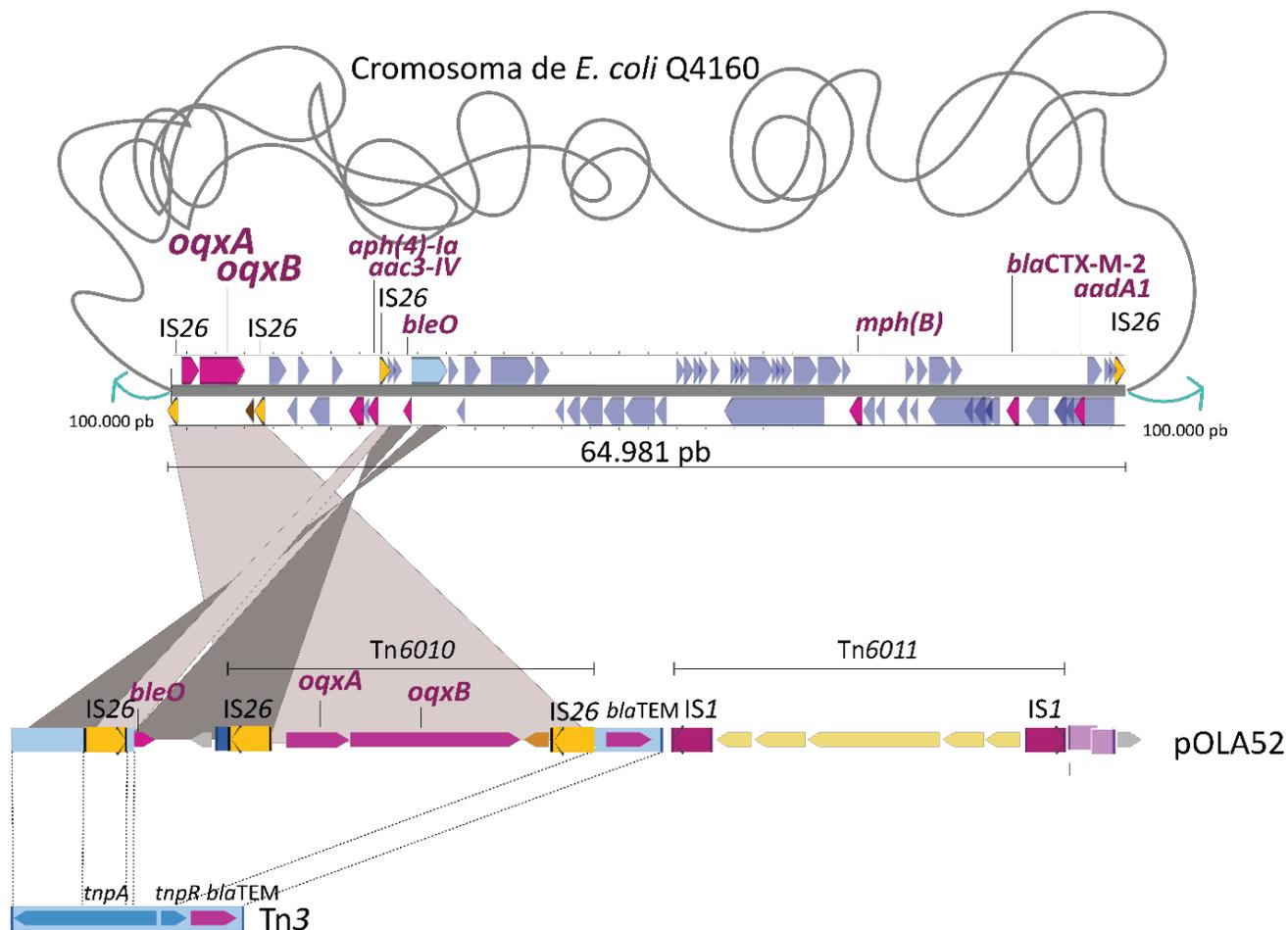


Figura 51. Localización de *oqxAB* en el cromosoma de *E. coli* Q4160 y comparación con su localización en pOLA52. La región del cromosoma de *E. coli* Q4160, que contiene *oqxAB* y está flanqueada por IS26 (64.981 pb) está representada en escala. Arriba y abajo de la línea gris gruesa se muestran los genes y ORFs (flechas) detectados en orientación directa y complementaria, respectivamente. Las copias de IS26 se indican en amarillo, y los genes de RAM en magenta. Las flechas celestes indican cuáles fueron las regiones de 100.000 pb que mostraron alta identidad con cromosomas de *E. coli*, cuando se compararon contra NCBI-BD. Abajo se muestra la región de 21 kb de pOLA52 que contiene *oqxAB*. En gris claro, y gris oscuro, se indican las regiones con identidad mayor al 99%, que están localizadas en orientación directa y opuesta, respectivamente. Al final de la figura, se representa el Tn3, y las líneas de puntos indican los fragmentos de este transposón en pOLA52, resultantes del clivaje por diversas inserciones de otros EGMs.

(b) *qnrA1*

El aislamiento *E. cloacae* M17464 multiresistente fue el único de la colección portador del gen *qnrA1*. M17464 mostró 2 plásmidos de aproximadamente 265 y 129 kb por endonucleasa S1. Inicialmente se había observado que el plásmido portador del *qnrA1* era conjugativo, pero el tamaño del plásmido fue diferente entre la dadora y su transconjugante, por lo que se secuenció al aislamiento clínico. El plásmido portador de *qnrA1* se llamó pEcl_M17464_274, tuvo un tamaño de 274.469 pb y perteneció al grupo HI con los dos replicones HI2 y HI2A. Mostró un porcentaje de IS de 8,91% y 9,4 de densidad de IS con 26 ISs, de las cuales 5 de ellas son copias de IS26.

El gen *qnrA1*, se encontró en una región rica en genes de RAM, localizado en la vr-2 de un ICC1, como se describió en la bibliografía¹⁴⁴, pero que fue probablemente interrumpido y movilizado por dos copias de IS26 en igual orientación. Como se muestra en la Figura 52, la copia de IS26 de la izquierda interrumpió un 3'CS2, mientras que la derecha clivó el 3'CS1.

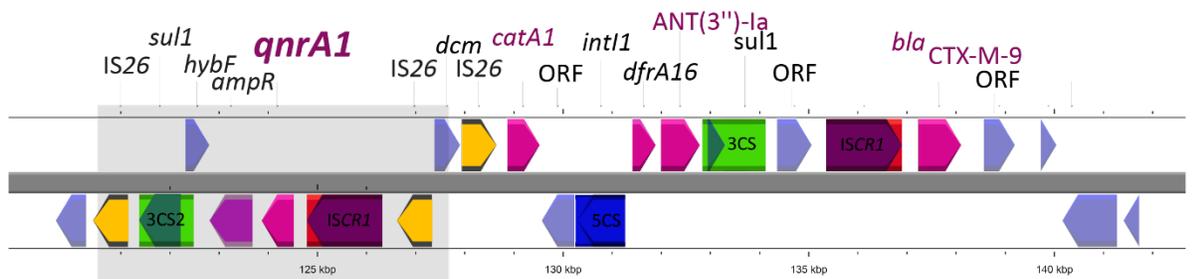


Figura 52. Entorno genético de *qnrA1* en pEcl_M17464_274. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada a este plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En fondo gris se resaltan los genes del entorno de *qnrA1* flanqueado por dos copias de IS26 resaltadas en amarillas con borde negro.

El plásmido pEcl_M17464_274 es uno de los que poseen más integrones de la plasmoteca. Además del ICC1 remanente portador de *qnrA1*, se encontraron un IC1 y un ICC1. Esto constituyó el primer reporte de *qnrA1* en aislamientos clínicos de humanos de Argentina.

Por último, también se encontró en pEcl_M17464_274 el gen *mcr-9*, identificado recientemente.¹⁴⁵ Como se mencionó anteriormente la expresión del gen *mcr-9* necesita de dos genes adicionales que no se encontraron presentes en este plásmido. El gen *mcr-9* se encontró flanqueado por dos IS (IS903 e IS1R), que probablemente sean las responsables de su movilización.

En la comparación con la PLSDb se encontraron 52 plásmidos con identidad mayor al 99% con pEcl_M17464_274, la mayoría aislados de enterobacterias de muestras clínicas de humanos, dispersos por todos los continentes, menos en Sudamérica.

(c) *qnrB1*

La plasmoteca contenía 3 plásmidos portadores del gen *qnrB1*: pKpnM9863_183, pKpnM21014_175 y pPstM22246_146 que mostraron la capacidad de transferirse mediante conjugación biparental. Aunque los últimos dos plásmidos provenían de aislamientos clínicos de especies distintas, fueron muy similares entre sí: pKpnM21014_175 (175.492 pb) contiene en su totalidad a pPstM22246_146 (146.393 pb) con un 99% de identidad y ambos pertenecían al grupo C. Las diferencias entre estos dos plásmidos se evidenciaron en un alineamiento entre ellos, y radicaron en las regiones que contenían los genes de RAM. Estas diferencias podrían explicarse mediante tres series de rearrreglos genómicos. En primer lugar, es necesario considerar que el plásmido pKpnM21014_175 contenía dos regiones *tetR/tetA* mientras que pPstM22246_146 tenía sólo una. La existencia de la estructura flanqueada por las dos copias de *tetR/tetA* en pKpnM21014_175, podría explicarse mediante una recombinación homóloga seguida de una inversión. La recombinación homóloga se habría dado entre *tetR/tetA* de pPstM22246_146 y *tetR/tetA* de una hipotética unidad translocable que contendría además el fragmento extra de pKpnM21014_175 que contiene los genes de RAM *mph(E)* y *msr(E)* y cuatro copias de IS26. (Fragmento marcado como “C” en Figura 53). Consecutivamente, habría ocurrido una inversión en la región que contenía el gen *qnrB1* y junto con un fragmento de IC1 que contenía 5’CS y el casete *dfrA14* (Fragmento marcado como “B” en la Figura 53). Sin embargo, las evidencias disponibles para esta tesis no fueron suficientes para dilucidar el mecanismo genético que pudo producir esta inversión.

En segundo lugar, el otro fragmento que contenía los genes adicionales de pKpnM21014_175, *aac(6')-Ib-cr5*, *blaOXA-1*, y *aac(3)-Ile*, podría haber sido adquirida por este plásmido gracias a las diversas copias de IS26 presentes en el mismo (Fragmento marcado como “A” en Figura 53).

Por último, en tercer lugar, el plásmido pKpnM21014_175 contenía una región de 3.515 pb constituida por IS26/5’CS/*dfrA14*, que se encontró duplicada e invertida en pPstM22246_146. Es muy probable que esta región se haya duplicado (en una posible línea evolutiva de pKpnM21014_175 a pPstM22246_146) o escindido (en una posible línea evolutiva inversa) mediante un rearrreglo genómico mediado por IS26.

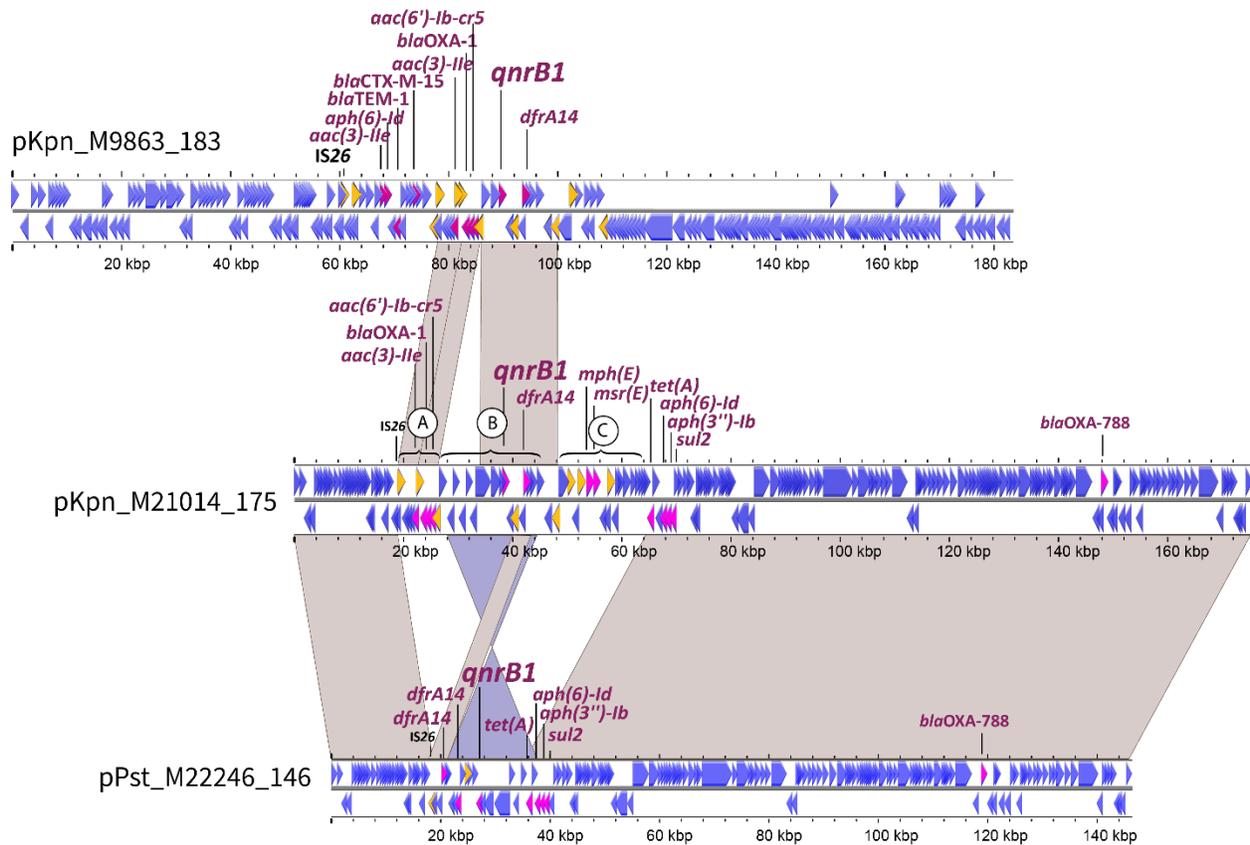


Figura 53. Alineamiento de los tres plásmidos portadores de *qnrB1*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y en amarillo las copias de IS26. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris aquellas con orientación directa y en azul con orientación complementaria. Las regiones “A”, “B” y “C” se explican en los resultados.

El plásmido que contiene mayor cantidad de genes de RAM (pKpnM21014_175) tendría una ventaja evolutiva en un ambiente con alta presión de selección antimicrobiana.

Por otra parte, el tercer plásmido de la colección que contiene *qnrB1*, denominado pKpn_M9863_183 (183.544 pb) pertenecía al grupo F con las replicasas FIB(K) y FII(K). El 14,6% de la secuencia de este plásmido estaba constituido por IS, con una densidad de 17,4 IS por 10^5 pb. Además, pKpnM9863_183 contiene 12 copias de IS26 en un segmento acotado de 50721 pb. Dentro de esta región se encuentran todos los genes de RAM del plásmido, formando lo que se denomina un grupo de genes de resistencia ligados a IS26 (*IS26-bounded resistance gene cluster*). Se observó un EGM derivado de *ISEcp1* que contenía *bla*_{CTX-M-15} con la capacidad de movilizar este gen independientemente de los rearrreglos genómicos que puedan generar las diferentes copias de IS26. Dado que pKpnM9863_183 pertenece a otro grupo de plásmidos, la región de alta identidad con los otros plásmidos descriptos previamente fue mucho menor. Sin embargo, en el alineamiento de los tres plásmidos portadores de *qnrB1* (Figura 53) se observó que este gen se

encuentra en una región común entre ellos de 13.962 pb con una identidad mayor al 99%, flanqueada en pKpnM9863_183 por IS26 e IS6100 (Figura 54). Si bien no fue posible encontrar evidencia directa de que defina un EGM responsable de la movilidad de *qnrB1*, la gran abundancia de IS26 en pKpnM9863_183 y pKpnM21014_175 sugiere que esta IS podría estar involucrada en la movilización de este gen. Además, la presencia de *qnrB1* con entornos genéticos comunes en plásmidos de diferentes grupos, apoya esta hipótesis.

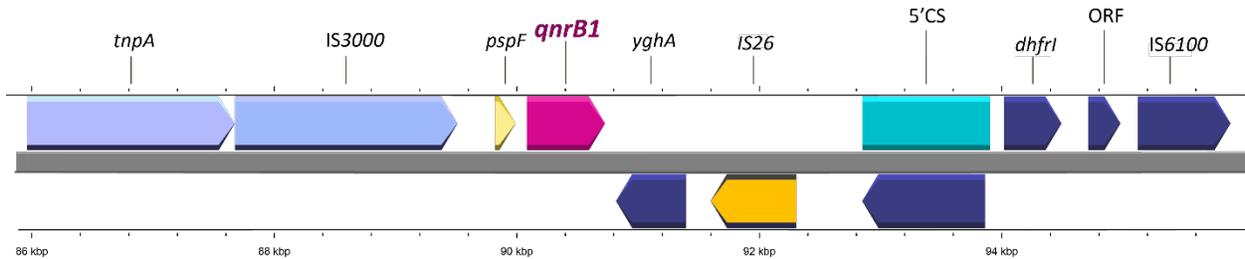


Figura 54. Entorno genético de *qnrB1* en común entre los tres plásmidos (pKpnM9863_183, pKpnM21014_175 y pPstM22246_146). Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada a este plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. La IS26 se resalta en amarillo con borde negro.

(d) *qnrB2*

Cinco plásmidos de la plasmoteca contenían *qnrB2*. Los 5 aislamientos portadores mostraron la siguiente diversidad de especies: *E. coli* M9902, *K. oxytoca* Q4020, *Salmonella* M9966, *K. pneumoniae* Q1211 y *K. pneumoniae* Q4016. Todos estos aislamientos pudieron transferir el PMQR mediante conjugación.

En todos los casos *qnrB2*, estaba contenido en la *vr-2* de un ICC1, junto con fragmentos del operón *sap* y del gen *pspF*, como se describió previamente¹⁴⁶. Sin embargo, estos cinco ICC1 se clasificaron en dos grupos según los genes de RAM encontrados en la *vr-1* (Figura 55). El primer grupo (A) sólo contenía el casete *dfra25* en la *vr-1* y estaba localizado en los plásmidos pEco_M9902_127 y pKox_Q4020_53 ambos del grupo N. El plásmido pEco_M9902_127, de mayor tamaño (127921 pb), contenía a pKox_Q4020_53 (100% de cobertura y 99.94% de identidad), pero además se encontró fusionado con otro plásmido (plásmido híbrido) mediante recombinación homóloga. Este plásmido, pEco_M9902_127 (127.921 pb), contenía dos replicas de grupos diferentes: N y FII. También se encontraron dos regiones con T4SS, sólo un *oriT* y un T4CP. También se observó un alto porcentaje de IS (12.9%) y densidad de copias de IS (14.07), y con 6 copias de IS26. Estos resultados sugirieron una posible fusión entre dos plásmidos, uno de ellos pKox_Q4020_53 que se discute en la sección 5.07 - a). Además de *qnrB2* el plásmido pEco_M9902_127 contenía los siguientes genes RAM: *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1B}*, *aac(6')-Ib-cr5*, *tet(A)* y *bla_{OXA-1}* en una región rica en IS26. El 5'CS del ICC1 de este plásmido estaba interrumpido por una región flanqueada por IS26. El otro plásmido del grupo A, pKox_Q4020_53

(53.237 pb), no tenía el 5'CS del ICC1 truncado por el fragmento flanqueado por IS26. A diferencia del pEco_M9902_127, el único gen relevante de RAM además de *qnrB2* y *dfrA25* fue *tet(A)*.

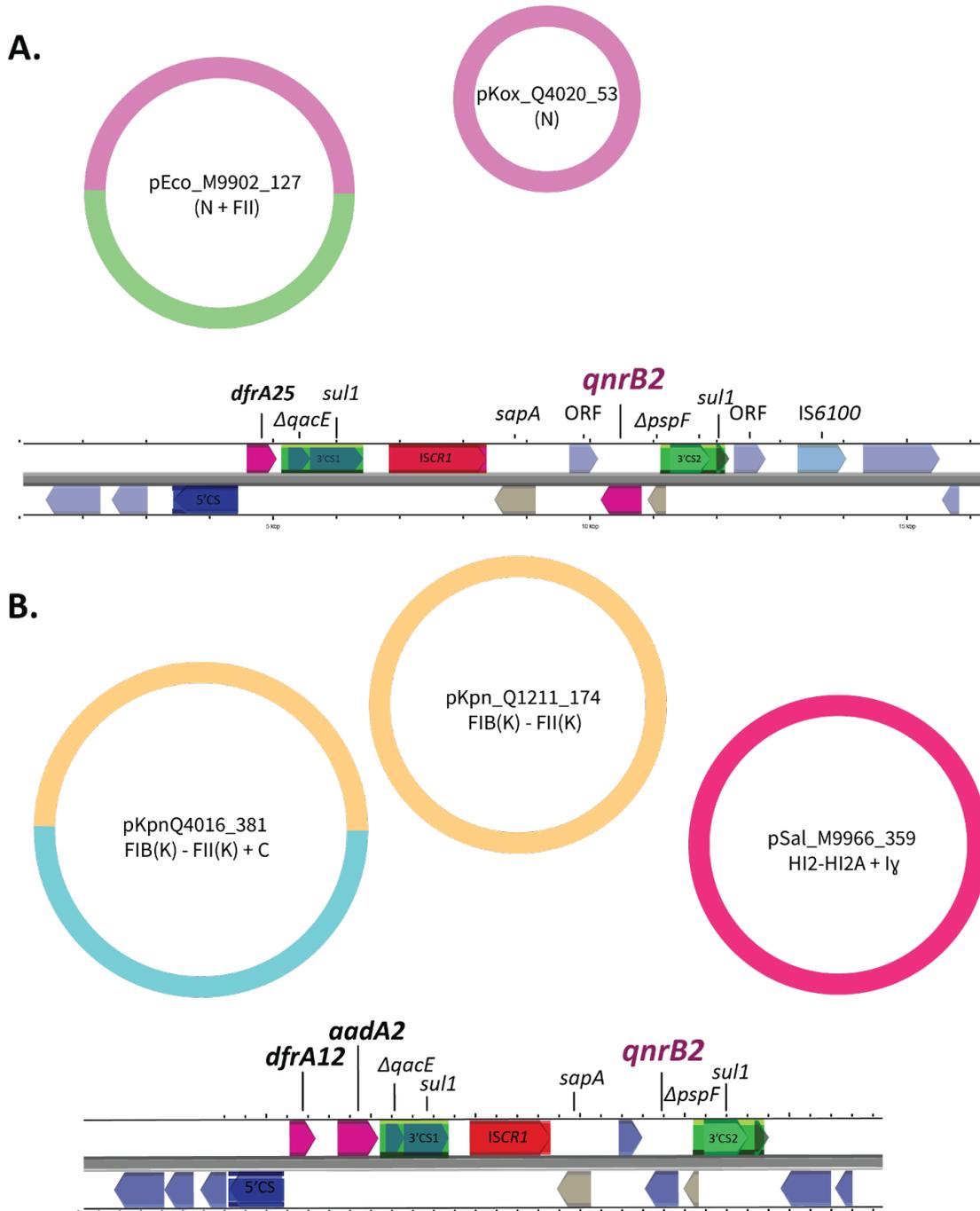


Figura 55. Integrones portadores de *qnrB2*. Se detallan los grupos de plásmidos A y B separados según la combinación de casetes de la *vr-1* encontrada en los integrones portadores de *qnrB2*. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris $\Delta ps p$ y *sapA*. Arriba de cada integrón, en forma de círculo se esquematizan los plásmidos (no están a escala), con colores diferentes según el grupo de plásmidos al que pertenecen.

Los integrones portadores de *qnrB2* del segundo grupo (B), contenían *dfrA12* y *aadA2* en la *vr-1* y se encontraron en tres plásmidos de esta colección: pSal_M9966_359, pKpn_Q1211_174, y pKpnQ4016_381. Dos de ellos pertenecían al grupo F, con las replicasas FIB(K) y FII(K), pKpn_Q1211_174 (174.963 pb) y pKpnQ4016_381 (381.943 pb), y estaban relacionados entre sí. El plásmido pKpn_Q1211_174 estaba 100% contenido, con 99.5% de identidad en pKpnQ4016_381 el cual además se fusionó con otro plásmido del grupo C (plásmido híbrido); estos resultados se discuten en detalle en la sección 5.07 - b. Además de *qnrB2* y los genes de la *vr-1*, pKpn_Q1211_174 contenía sólo otro gen relevante de RAM: *catA1*. En cambio, en la fusión de replicones pKpnQ4016_381 adquirió además: *bla_{OXA-1}*, *mph(A)*, *aac(3)-IIa*, y *aac(6')-Ib'*. El tercer plásmido pSal_M9966_359, no estuvo relacionado con los dos anteriores, y contenía una fusión de replicones de los grupos HI e I (Figura 55). Los tres ICC1 de este grupo, fueron casi idénticos entre sí, a excepción del ICC1 de pSal_M9966_359, que tenía una repetición en tandem de la *vr-2* que alojaba a *qnrB2* y del 3'CS2, (integrón twin): (*ISCR1/sapA/qnrB2/ΔpspF/3'CS2/ISCR1/sapA/qnrB2/ΔpspF/3'CS3*). Además este plásmido contenía otros genes de RAM relevantes: *tet(B)* y *floR*.

Además del mapeo inverso de lecturas largas de ONT, se realizó un ensayo de PCR para evaluar si esta repetición en tándem no se debía a un artefacto de secuenciación o de ensamble. El ensayo consistió en amplificar un fragmento que unía ambas repeticiones. Utilizando los cebadores *qnrB_out5* y *InsB6(R)*, diseñados en los extremos 3' de *qnrB2* y del ORF513 (*ISCR1*) respectivamente, en dirección saliente (marcados en flechas verdes por fuera del esquema en la Figura 56). El tamaño esperado del amplicón fue de 3.482 pb, y en el caso en que el integrón no posea la repetición, no debería obtenerse amplificación. Se realizó la PCR para el aislamiento clínico M9966, para su transconjugante M23152 (portadora del plásmido con la repetición en tándem pSal_M9966_359), y para las dos transconjugantes TC-M23202 y TC-M23381 portadoras de los plásmidos pKpn_Q1211_174 y pKpnQ4016_381 respectivamente, que contienen el mismo integrón sin la repetición en tándem. La TC-M23152 portadora de pSal_M9966_359 fue la única cepa en la cual se obtuvo amplificación observándose un amplicón del tamaño esperado. Este amplicón se secuenció con Sanger y la secuencia obtenida resultó 100% idéntica a la obtenida por NGS. Como en el aislamiento clínico no se observó amplificación, se consideró que la duplicación de la región que contenía *qnrB2* se produjo por un rearrreglo genómico durante el evento de conjugación.

Se propone un modelo para explicar los rearrreglos que pudieron dar lugar a este integrón twin (Figura 56). Dos moléculas portadoras del ICC1 se fusionaron mediante una recombinación homóloga, entre el 3'CS1 de una de ellas y el 3'CS2 de la otra. En este proceso se obtiene como resultado un cointegrado con un ICC1 con la *vr-2* duplicada, y un integrón simple en la misma estructura molecular. Esta estructura se resuelve mediante otra recombinación homóloga, esta vez mediante el 3'CS3 y el 3'CS del integrón simple. Como resultado, se obtienen dos moléculas: una con un integrón "twin", y otra con un integrón simple.

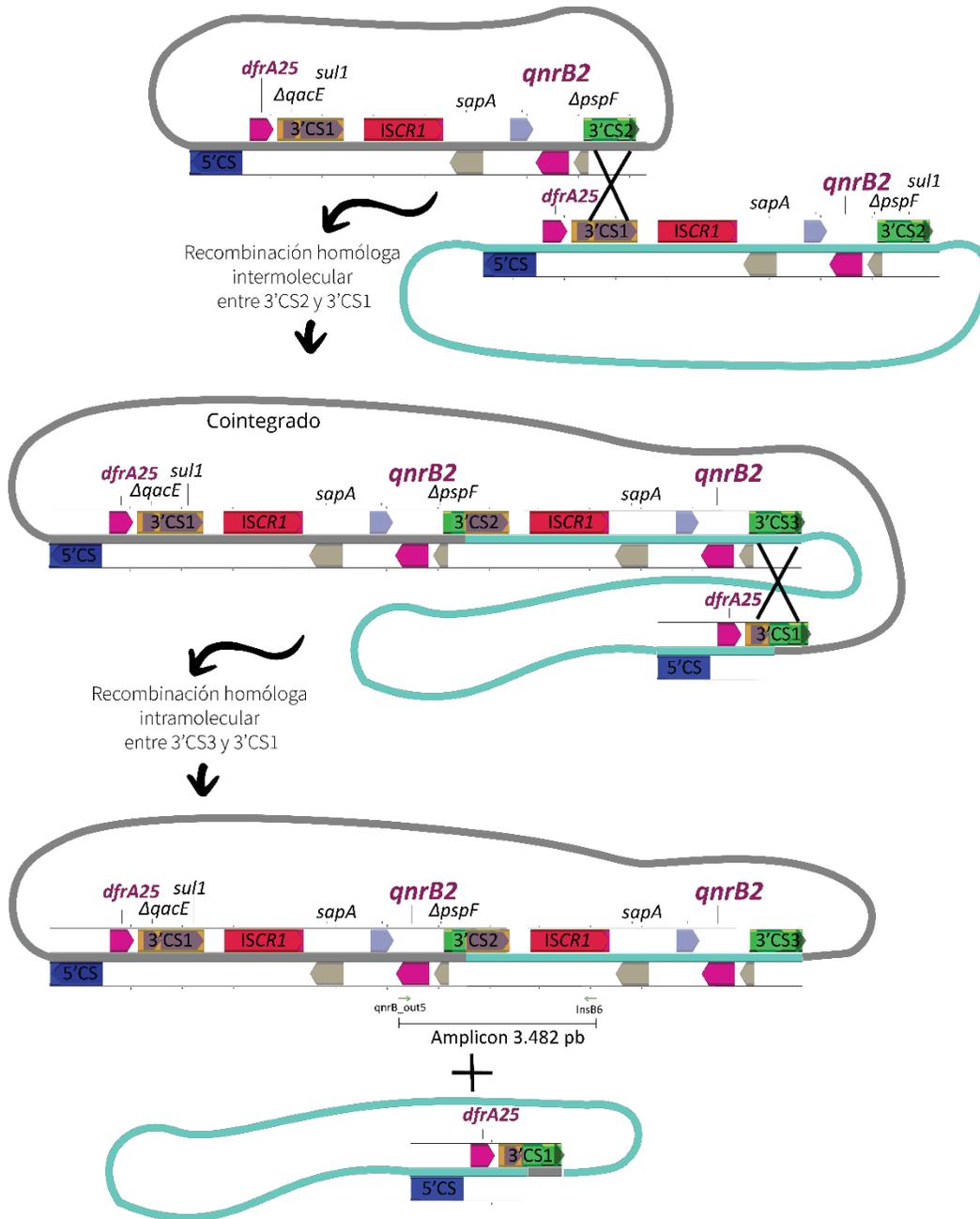


Figura 56. Modelo de recombinación homóloga que daría origen al integrón twin con dos copias de *qnrB2*. Las líneas gris y celeste representan secuencias de plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, los 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris *Δpsp* y *sapA*. Las líneas gris y celeste representan los plásmidos parentales que habrían dado lugar a una recombinación homóloga intermolecular (representada con una cruz) entre el 3'CS1 y 3'CS2 de los ICC1 portadores de *qnrB2*, como producto se obtendría una fusión de ambos replicones, con un integrón twin y un integrón simple. Una segunda recombinación homóloga intramolecular entre el 3'CS3 del integrón twin, y el 3'CS del integrón simple generados del paso anterior, resolvería la estructura del cointegrado, para dar lugar al plásmido encontrado en la plasmoteca con dos copias de *qnrB2*. En este último plásmido, también se detallan los sitios de unión de los cebadores y el amplicón obtenido.

En resumen, *qnrB2* se localizó en una plataforma genómica única (vr-2 de ICC1) pero potenciada desde el punto de vista de la resistencia múltiple por la diversidad de casetes que pueden localizarse en la vr-1. Además, con la posibilidad de generar recombinación homóloga en el 3'CS2, lo cual en este caso habría producido la duplicación de *qnrB2*. Asimismo, este ICC1 se encontró en diversos grupos de plásmidos, presentes en cuatro especies Enterobacteriales lo cual sugiere que dicha plataforma única tiene la posibilidad de movilizarse a diferentes localizaciones genéticas.

(e) *qnrB4* y *qnrB52*

Los genes *qnrB4* y *qnrB52* sólo se encontraron en un único aislamiento de las colecciones utilizadas para realizar esta tesis. Estos genes estaban localizados en diferentes plásmidos conjugativos: pKqsq_M17277_477 (477.340 pb) y pKqsq_M17277_123 (123.307 pb), respectivamente, este último además contenía *aac(6')-Ib-cr5*. El aislamiento portador de estos genes PMQRs fue la *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae* M17277 que se aisló junto con otras 4 enterobacterias de un paciente pediátrico. Este hallazgo permitió realizar el primer reporte de *qnrB4* y *qnrB52* en Argentina.

El plásmido pKqsq_M17277_477 es uno de los dos que contenía mayor cantidad de copias (12) de IS26. Cabe destacar que, si bien es conjugativo, sólo se pudo transferir únicamente utilizando una temperatura menor a la habitual (25-30°C) ya que pertenece al grupo HI, que posee un sistema de conjugación termosensible.

El gen *qnrB4* se encontró en la vr-2 de un ICC1 flanqueado por el operón *psp*, y los genes *bla_{DHA-1}* y *ampR* río arriba, y el operón *sap* río abajo. En la vr-1 del integrón se encontraron otros genes de RAM: *aac(6')-IIC*, *ereA2*, clivado por transposon derivado de IS1247 que contenía *aac(3)Ile* y *arr*. Este ICC1 estaba contenido en una IS26-bounded resistance gene cluster de 44.907 pb, el cual contenía 10 de los 15 genes de RAM detectados en el plásmido. Además de los mencionados previamente, otros genes de RAM relevantes fueron: *mphA*, *aph(3')-Ia*, y *tet(D)* y un integrón simple con *dfrA12* y *aadA2* (Figura 57).

La comparación del ICC1 con *qnrB4* en la base de datos mostró solo 4 casos con 100% de cobertura y 99,86-99,94% de identidad, correspondientes a plásmidos de enterobacterias: pCNR48: 319.209 pb, *K. pneumoniae*, Francia; pIMP26: 329.420 pb, *E. cloacae*, China; pQnrB4_020042, 328.828 pb, *E. hormaechei*, China; y p505108-MDR, 312.880 pb, *Cronobacter sakazakii*, China.

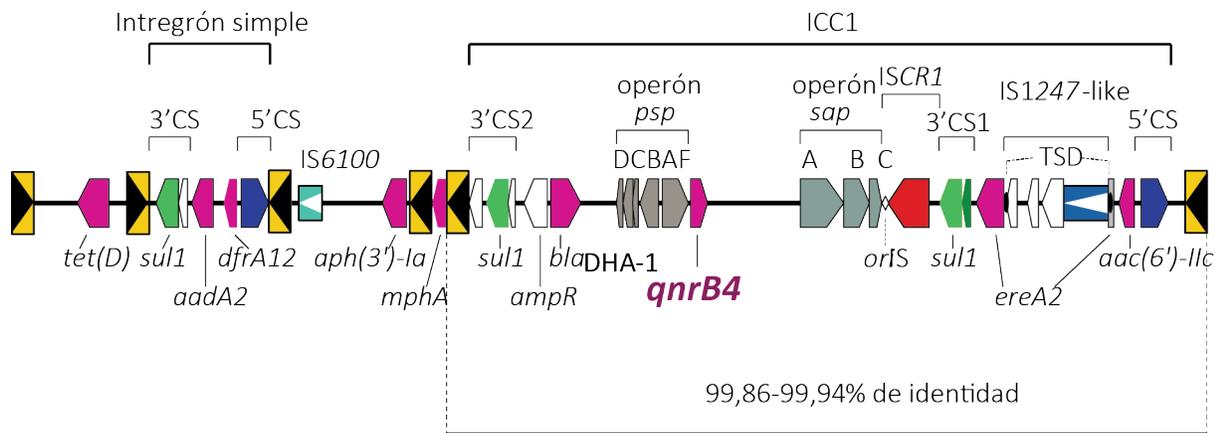


Figura 57. IS26-bounded resistance gene cluster conteniendo *qnrB4*. La línea negra representa la secuencia de ADN, las flechas y su orientación representan los diferentes ORFs. Los genes se detallan con los siguientes colores: magenta para los genes de RAM, verde 3'CS, rojo ORF513 del ISCR1, gris genes de los operones que acompañan a *qnrB4*, amarillo IS26.

Además, se comparó a pKqsq_M17277_477 con los 10 plásmidos de mayor cobertura de la NCBI-BD y se encontró que compartían entre 54% al 62% (Figura 58).

En otra región por fuera del IS26-bounded resistance gene cluster se encontraron otros genes de RAM: *bla_{SHV-12}*, *catA2* y el gen *mcr-9* sin los genes *qseC* y *qseB* que permiten su expresión (Figura 58)¹⁴³, lo cual explica la ausencia de resistencia a colistín en M17277.

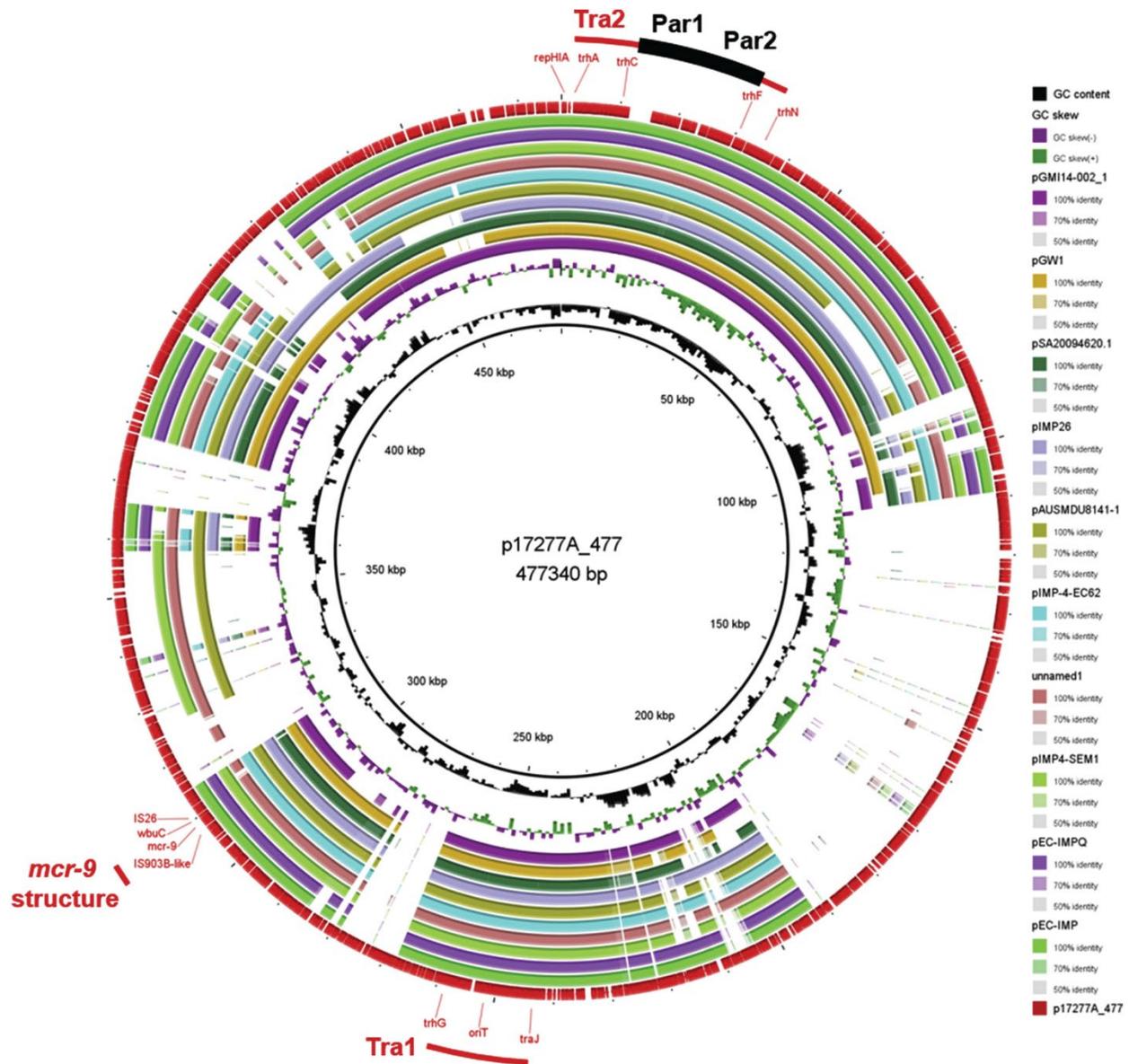


Figura 58. Comparación de pKqsq_M17277_477 con los diez plásmidos de NCBI-BD con mayor identidad mediante BRIG. La línea negra representa la secuencia de ADN con la numeración comenzando en la primera base del gen *repFII*. Los ORFs de pKqsq_M17277_477 se representan mediante flechas, en el anillo exterior color rojo. Desde adentro hacia fuera se muestran los plásmidos con los números de acceso entre paréntesis: pGMI14-002_1 (CP028197.1); pGW1 (CP028975.1); pSA20094620.1 (CP030186.1); pIMP26 (MH399264.1); pAUSMDU8141-1 (CP022696.1); pIMP-4-EC62 (MH829594.1); unnamed1 (CP020529.1); pIMP4-SEM1 (KX810825.1); pEC-IMPQ (EU855788.1); y pEC-IMP (EU855787.1).

El plásmido pKqsq_M17277_123 portador de *qnrB52*, perteneció al grupo FII. En la NCBI-BD se encontraron cinco plásmidos con cobertura de 23% a 92% para pKqsq_M17277_123. Los análisis bioinformáticos, por BRIG y por ACT revelaron que existe una elevada relación entre ellos (Figura 59).

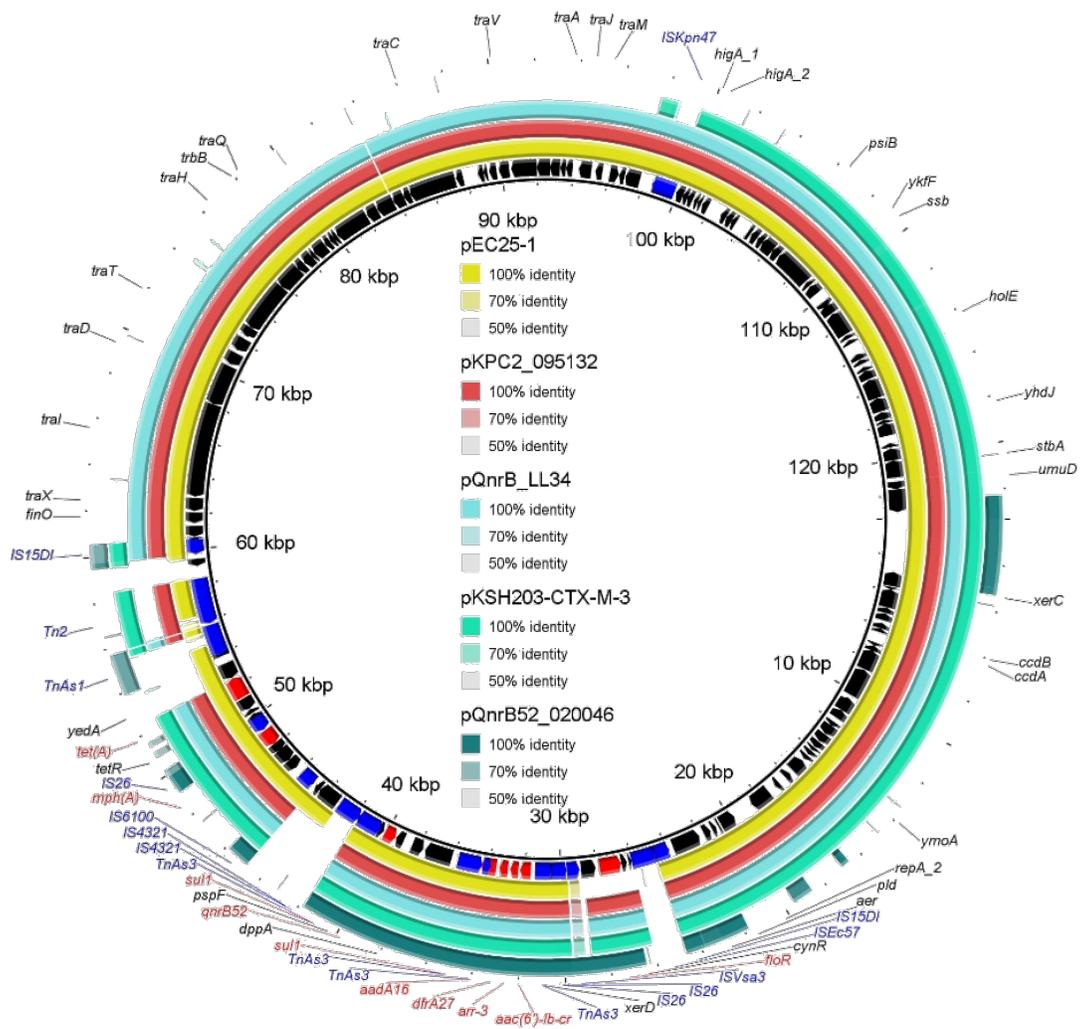


Figura 59. Comparación de pKqsq_M17277_123 con los cinco plásmidos de NCBI-BD con mayor identidad mediante BRIG. La línea negra representa la secuencia de ADN con la numeración comenzando en la primera base del gen *repHIA*. Los ORFs se representan mediante flechas, con su orientación. Desde adentro hacia fuera se muestran los plásmidos con los números de acceso entre paréntesis: pEc25-1 (CP035124.1); pKPC2_095132 (CP028389.3); pQnrB2_LL34 (CP025966.2); pKSH203-CTX-M-3 (CP034325.1); y pQnrB52_020046 (CP027872).

Como es habitual para los genes *qnrB*, el alelo *qnrB52* se encontró en la vr-2 de un ICC1, flanqueado por *sapA* y Δ *pspF*. Además, en la vr-1 del integrón se encontraron los genes de RAM: *aac(6')-Ib-cr5*, *arr-3*, *dfrA27*, y *aadA16*. Este ICC1 se encontró flanqueado por IS26 en el extremo 5'CS e IS4321R en el extremo 3'CS. Otros genes de RAM relevantes localizados en este plásmido fueron: *floR*, *tet(A)*, *mph(A)* y *bleO*. Comparando el ICC1 que contiene *qnrB52* con NCBI-BD se encontraron cinco plásmidos de *K. pneumoniae* y *E.coli* de China, con 100% de cobertura y 99,9-100% de identidad. Estos 5 casos, también tenían una IS26 en el extremo 5'CS, pero a 418 o 638 pb río abajo de éste, y no tenían IS4321 (Figura 60).

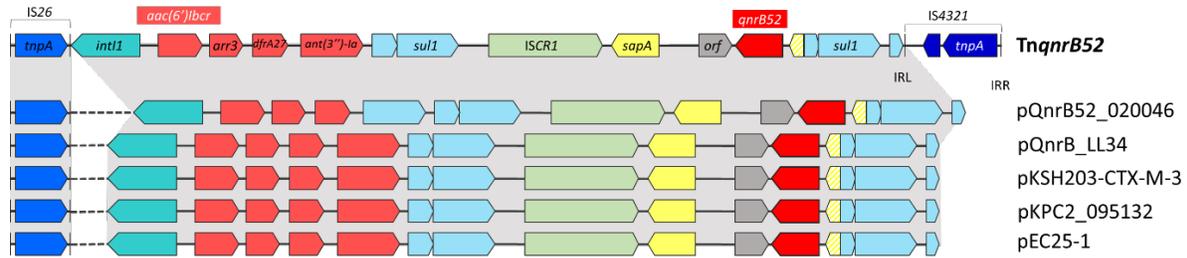


Figura 60. Comparación del ICC1 del pKqsq_M17277_123 con NCBI-BD. La línea negra representa la secuencia de ADN y los ORFs se mediante flechas, con su orientación. Se encontraron 5 plásmidos con 100% de cobertura y 99,98-100% de identidad para el integrón de *qnrB52*: pQnrB52_020046, *K. pneumoniae* (CP028782); pQnrB_LL34, *K. pneumoniae* (CP025966); pKSH203-CTX-M-3, *K. pneumoniae* (CP034325); pKPC2_095132, *K. pneumoniae* (CP028389); y pEC25-1, *E. coli* (CP035124.1).

En resumen, dado que el ICC1 que contiene *qnrB4* estaba flanqueado por dos copias de IS26 en el mismo sentido, y esta estructura se encontró en cinco plásmidos de cinco especies distintas de Enterobacteriales (incluyendo este reporte), es muy posible que *qnrB4* se disemine en dicha estructura mediante IS26. En cambio, en el caso de *qnrB52*, si bien este gen se encontró en un ICC1 previamente detectado en enterobacterias de otras regiones, las secuencias obtenidas de NCBI-BD no mostraron que esta estructura estuviera flanqueada por dos copias de IS26. Sin embargo, la copia de IS26 que flanquea el ICC1 de *qnrB52* podría ser responsable de su movilización, por ejemplo, mediante la generación de una unidad translocable.

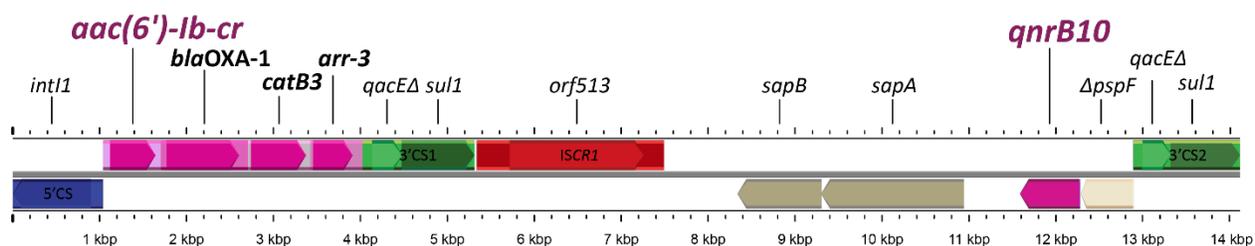
(f) *qnrB10*

Diez plásmidos de la plasmoteca contenían *qnrB10* sólo o combinado con distintos alelos de *aac(6')-Ib-cr*. En los diez casos *qnrB10* se encontró en la vr-2 de ICC1, flanqueado por el operón *sapCBA* (el gen *sapC* truncado) y un fragmento del gen *pspF*, como se describió previamente.^{74, 82} Sin embargo, se encontraron diferencias relevantes en las estructuras de los ICC1 portadores de *qnrB10* que pueden agruparse en: (a) ICC1 completos, (b) incompletos, y (c) otros con doble ISCR1, mencionados en esta tesis como “twin” (Tabla 11).

a) Se encontraron tres plásmidos con el ICC1 completo: pKva_M7943_60, pKpn_M9828_71 y pKpn_M11085_64. Todos pertenecían al grupo N, y pKpn_M9828_71 y pKva_M7943_60 fueron muy similares, mientras que pKpn_M11085_64 pertenecía al subtipo N3.

Los ICC1 localizados en estos tres plásmidos sólo se diferenciaron en su vr-1. Uno de ellos, correspondió al plásmido pKva_M7943_60 del aislamiento *K. variicola* M7943. La secuencia de este ICC1 denominado In37::ISCR1::*qnrB10* constituyó el primer reporte de *qnrB10* en el mundo⁸², pero hasta la fecha no se había descrito el plásmido portador. La vr-1 de este ICC1 estaba compuesta por los casetes *aac(6')-Ib-cr5*, *bla_{OXA-1}*, *catB3*, y *arr-3*. (Figura 61. In37::ISCR1::*qnrB10*).

A



In37::ISCR1::qnrB10

Figura 61. In37::ISCR1::qnrB10. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris Δ psp y sapA.

Los otros dos ICC1 de este grupo tuvieron vr-1 compuestas por *dfrA15/cmlA4/aadA2*, en pKpn_M9828_71, y *catB2/aac(6')-Ib* en pKpn_M11085_64. Esta última, no se observó en ningún otro ICC1 de la plasmoteca, ni tampoco se encontró en NCBI-BD hasta la fecha (diciembre 2022). Con la excepción del ICC1 del pKpn_M11085_64, los otros dos estuvieron flanqueados por IS26 e IS6100 en los extremos 5'CS y 3'CS2 respectivamente, que podrían ser los responsables de la movilidad y diseminación de esta estructura. Además de los genes de RAM incluidos en los ICC1, sólo el plásmido del grupo N3 contenía otro gen: *bla*_{SHV-5}.

Tabla 11. Plásmidos portadores de *qnrB10*.

Plásmido	TC	Longitud (pb)	Integrone	Grupos de plásmidos	% IS	Densidad de IS
pKpn_M11085_64	TC-M23174	64.387	ICC1	N3	2,55%	3,11
pKpn_M9314_63	TC-M23667	63.400	Integrón twin	N	4,00%	4,73
pCfr_Q4143_61	TC-M11222	61.205	Integrón twin	N	8,02%	9,80
pKpn_M9828_71	TC-M23439	71.868	ICC1	N	12,94%	16,70
pKva_M7943_60	TC-M23825	60.263	ICC1	N	5,57%	6,64
pKpn_Q5099_132	TC-M23428	132.807	1 Integrón simple, 1 Incompleto	C	19%	14,31
pEko_M9921_354	TC-M23665	354.216	1 Integrón simple, 1 Incompleto	HI2 - HI2A	13,49%	11,29
pEcl_Q5029_328	TC-M23426	328.541	1 Integrón simple, 1 Incompleto	HI2 - HI2A	13,00%	10,04
pSma_M9684_342	TC-M23252	342.804	1 Integrón simple, 1 Incompleto	HI2 - HI2A	10,57%	8,46
pEcl_M7916_325	TC-M23226	325.547	1 Integrón simple, 1 Incompleto	HI2 - HI2A	12,57%	10,44

b) Se encontraron 5 plásmidos que portaban un *qnrB10* en un contexto de un ICC1 incompleto. Todos ellos tuvieron una estructura que comprendía desde el 3'CS1, incluyendo al *ISCR1* y hasta el final del ICC1, y que mostró 100% de identidad con la secuencia correspondiente de *In37::ISCR1::qnrB10*.

Cuatro de los cinco plásmidos, pEko_M9921_354, pSma_M9684_342, pEcl_M7916_325, y pEcl_Q5029_328 fueron de gran tamaño y pertenecieron al grupo HI. En cambio, el plásmido pKpn_Q5099_132 fue de menor tamaño y perteneció al grupo C. Este plásmido se obtuvo por secuenciación del aislamiento clínico *Kpn* Q5099. Esto se debe a que, si bien se demostró que el plásmido portador del *qnrB10* era conjugativo, el ensayo de endonucleasa S1 mostró resultados discordantes entre los tamaños de los plásmidos de la transconjugante y del aislamiento dador, a pesar de que el ensayo se repitió reiteradas veces con el mismo resultado. Se concluyó que el plásmido probablemente sufrió rearrreglos genómicos.

La comparación de los cuatro plásmidos del grupo HI mostró niveles de cobertura genómica e identidad prácticamente iguales, aunque sufrieron múltiples rearrreglos genómicos que cambiaron la sintenia de los fragmentos que componen cada uno de los plásmidos (Figura 62).

En el fragmento marcado en rosa en la Figura 62, se encontraron los genes de RAM *aadA1* y *aac(6')-Ib-cr7*, en forma de casetes dentro de un Integrón simple, flanqueados por *IS26* e *IS1326*. El fragmento marcado en verde en la Figura 62, también se encontró en los 4 plásmidos HI, y en el del grupo C pKpn_Q5099_132 y contiene al ICC1 incompleto. En los cinco plásmidos este fragmento estaba flanqueado en el extremo del 3'CS1 por una *ISKox2* seguida por el gen de RAM *ere(A)* (Figura 63). Cabe destacar que la comparación de cualquiera de los plásmidos HI con el C mostró que la única región con identidad relevante entre ellos correspondía con este fragmento marcado en verde en la Figura 62.

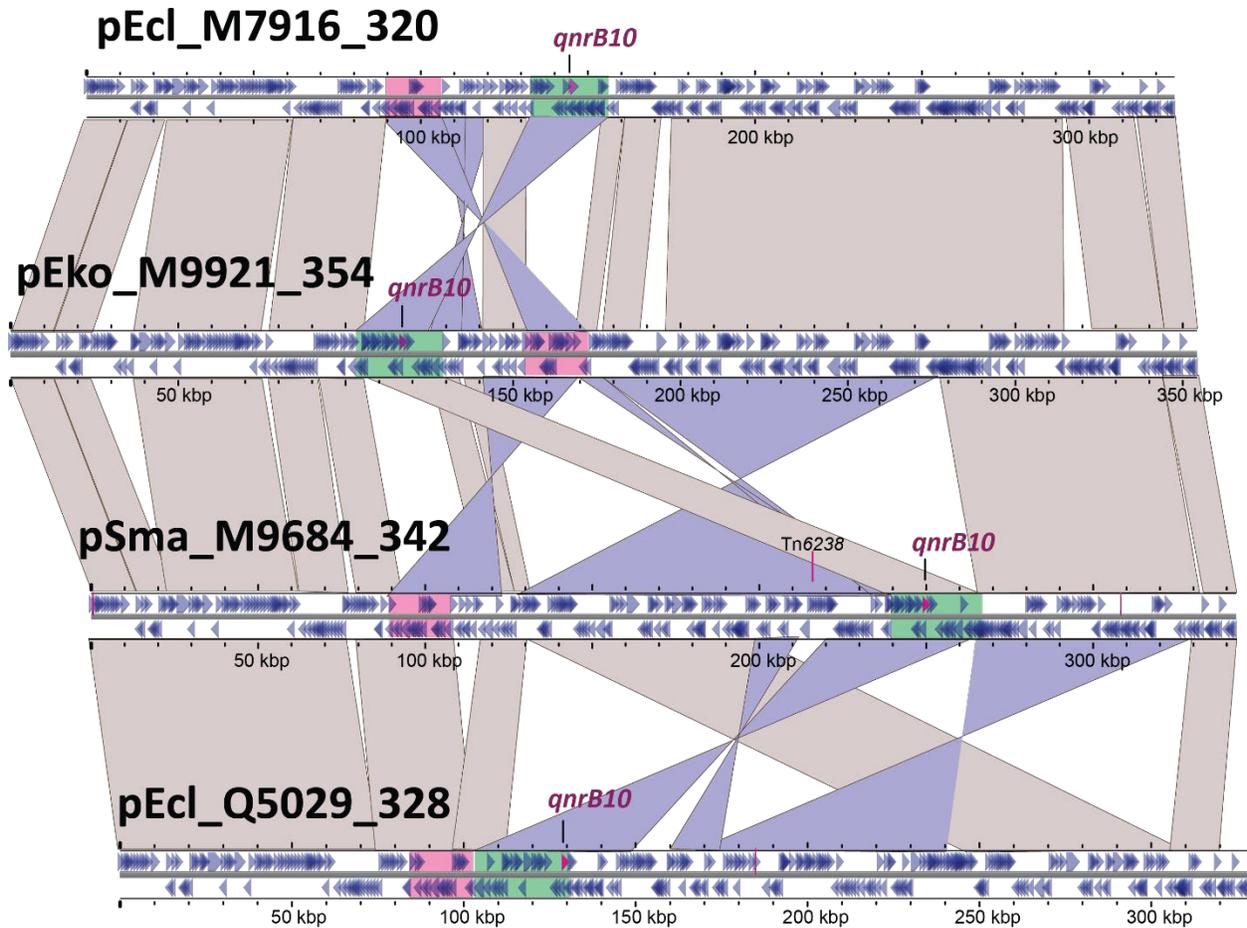


Figura 62. Comparación de los plásmidos del grupo HI portadores de *qnrB10*. Cada línea gris representa cada uno de los plásmidos que se alinearon. Por arriba y abajo de cada línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada en cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En color verde se resalta la región común más extensa que contiene el gen *qnrB10* y que comparten los cuatro plásmidos. En barras se resaltan las regiones entre los plásmidos con una identidad mayor al 98%, en gris aquellas con orientación directa y en azul con orientación complementaria.

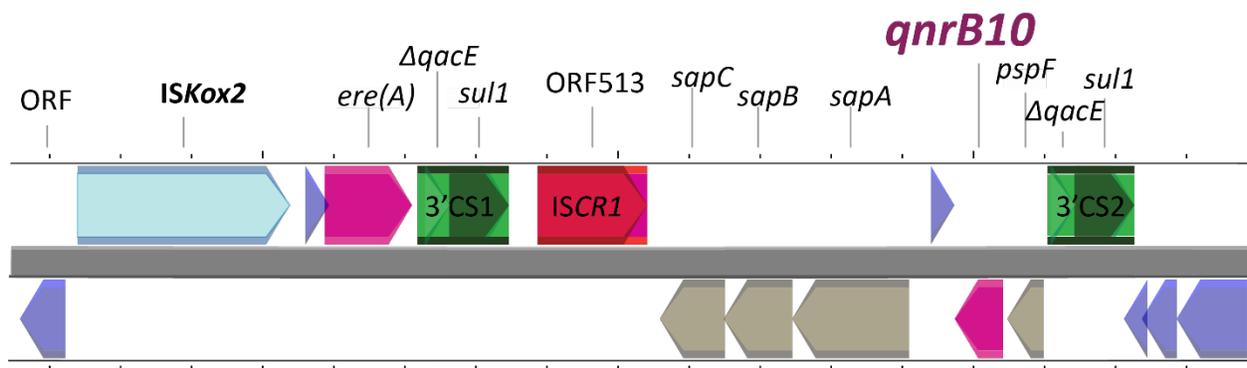
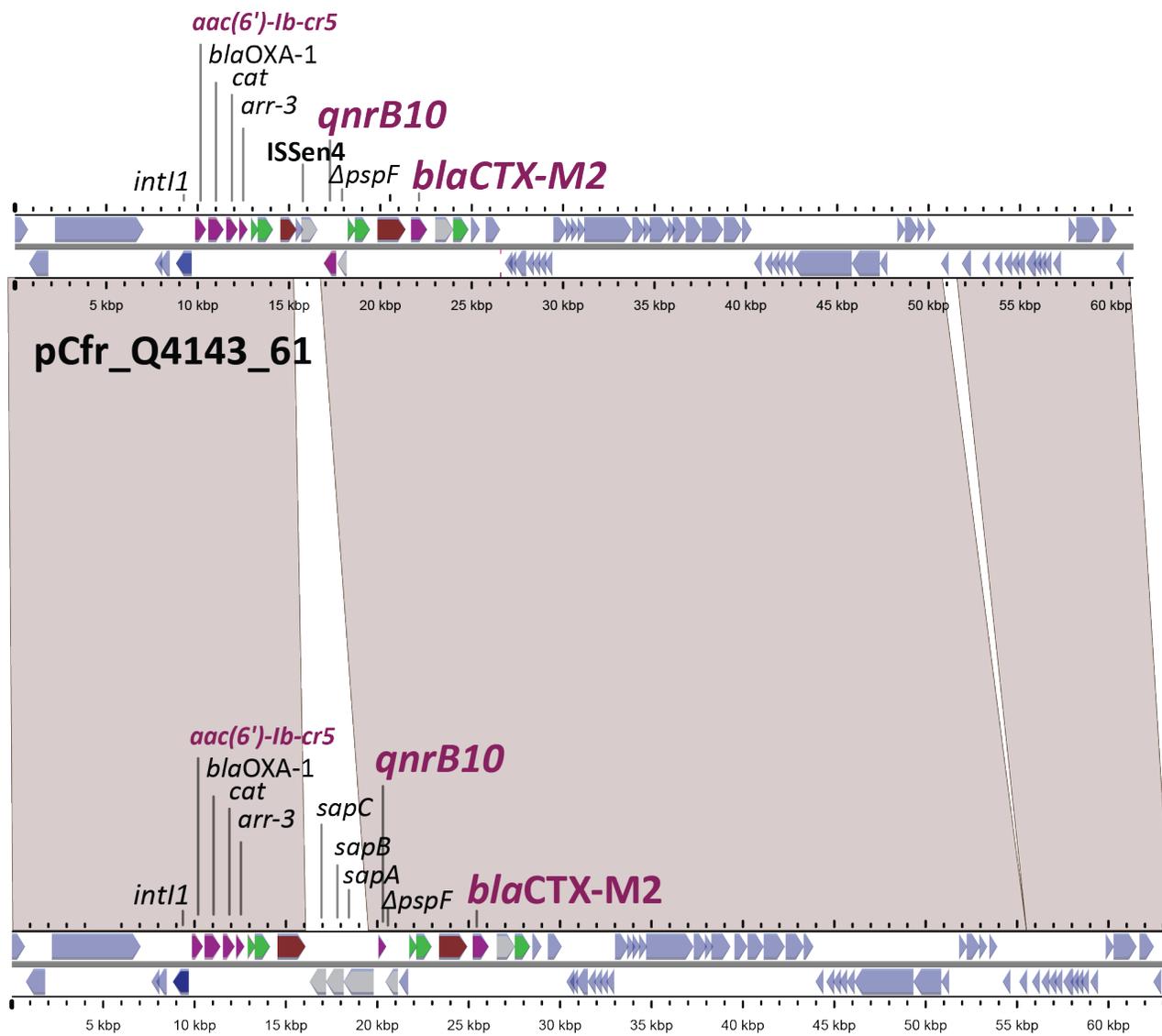


Figura 63. Región común entre los cinco plásmidos portadores de *qnrB10* en un ICC1 incompleto. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris Δ *psp* y los genes *sapCBA*.

La alta identidad entre los plásmidos HI y la gran diferencia en la sintenia de los fragmentos que los componen, reflejan el nivel de plasticidad de estos plásmidos. Los rearrreglos y combinaciones genéticas permiten que el plásmido adquiera genes que permiten a la bacteria subsistir a los diferentes ambientes con presión de selección, o bien que pierda aquellos fragmentos que implican un gasto fisiológico innecesario para la célula cuando esa presión de selección desaparece o cambia. El hallazgo de una única región de un ICC1 incompleto con el gen *qnrB10* en diferentes localizaciones en los plásmidos HI, sugiere fuertemente que este módulo tiene algún tipo de movilidad. Esta hipótesis se fortalece con el hallazgo de ese mismo fragmento en un plásmido de un grupo diferente, como es el grupo C.

c) En dos plásmidos pCfr_Q4143_61 y pKpn_M9314_63 se encontró a *qnrB10* en un contexto de integrón twin, es decir con doble *ISCR1*. Ambos pertenecieron al grupo N de plásmidos y contenían la maquinaria de conjugación completa. Estos plásmidos fueron muy similares entre sí, aunque vale la pena destacar algunas diferencias entre ellos (Figura 64). El plásmido pCfr_Q4143_61 sufrió una delección de un fragmento del operón *sapCBA*, debido a la inserción de una *ISSen4*, mientras que pKpn_M9314_63 tuvo una delección de 551 pb que no pudieron asociarse a ninguna IS.

Los integrones twin de estos plásmidos son prácticamente idénticos (Figura 65). La región vr-1 tuvo el mismo arreglo de casetes que In37::*ISCR1::qnrB10*, incluyendo *aac(6')-Ib-cr5*. Además de la vr-2 que contenía *qnrB10*, los integrones twin de estos plásmidos contenían una vr-2 adicional con el gen *bla_{CTX-M-2}*. Los rearrreglos genómicos que pudieron dar origen a la región vr-2 de los integrones twin se proponen en un modelo que se discute en la sección 5.07 - c.



pKpn_M9314_63

Figura 64. Comparación entre los plásmidos portadores de *qnrB10* y *bla_{CTX-M-2}* en un ICC1 twin. . Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris *Δpsp* y *sapA*. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras grises se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98%.

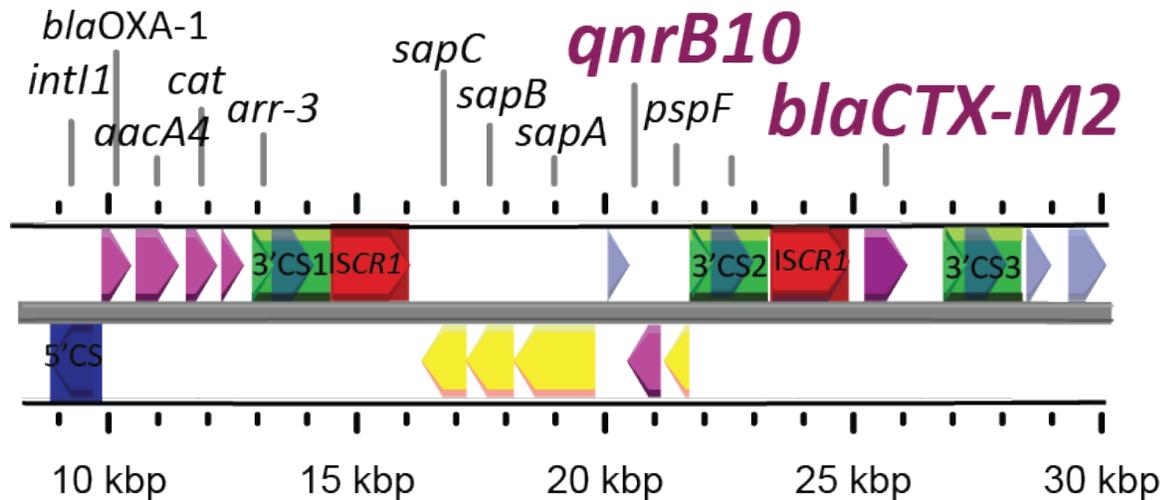


Figura 65. Integrón twin portador de *qnrB10* y *bla*_{CTX-M-2} encontrado en pKpn_M9314_63. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, los 3'CS en verde, ambas copias de *ISCR1* en rojo y en amarillo Δ *psp* y los genes *sapCBA*.

(g) *qnrB19*

En estudios previos, se determinó que el alelo *qnrB19* es uno de los tres PMQRs detectados con mayor frecuencia en Argentina. Asimismo, se habían descrito plásmidos tipo ColE1 portadores de *qnrB19* menores a 3,1 kb.^{74, 83, 83, 94} Como estos plásmidos ya se encontraban caracterizados, en este trabajo de tesis sólo se consideraron aquellos aislamientos que tenían *qnrB19* en plásmido de mayor tamaño.

Tres plásmidos de la plasmoteca contenían *qnrB19*: pEco_M9820_36 (36.539 pb), pEco_M11059_31 (31.584 pb) y pKpn_Q2108_343 de (343.372 pb).

Los plásmidos pEco_M9820_36 y pEco_M11059_31 pertenecieron al grupo X2. Estos plásmidos tuvieron un 100% de identidad entre ellos, pero difirieron en que pEco_M9820_36 tenía una secuencia adicional, correspondiente a la inserción de un Tn3, 772 pb río abajo del gen *qnrB19*. El Tn3 contiene una *bla*_{TEM-1B} (codifica para una β -lactamasa de espectro ampliado TEM-1 (Figura 66)¹⁴⁷. Esta única diferencia entre los plásmidos se vio reflejada en la diferencia en el perfil de sensibilidad a los antimicrobianos que presentaron ambos aislamientos, ya que a diferencia de M11059 (que contiene pEco_M11059_31), M9820 (que contiene pEco_M9820_36 con la inserción del Tn3) fue resistente a ampicilina.

En ambos plásmidos, *qnrB19* estuvo flanqueado por IS26 (río arriba), y una *tnpA* del Tn1721 (río abajo), interrumpida por el Tn3 en el plásmido pEco_M9820_36 y contenía una única copia de IS26 y el porcentaje de IS fue de los más bajos de la plasmoteca.

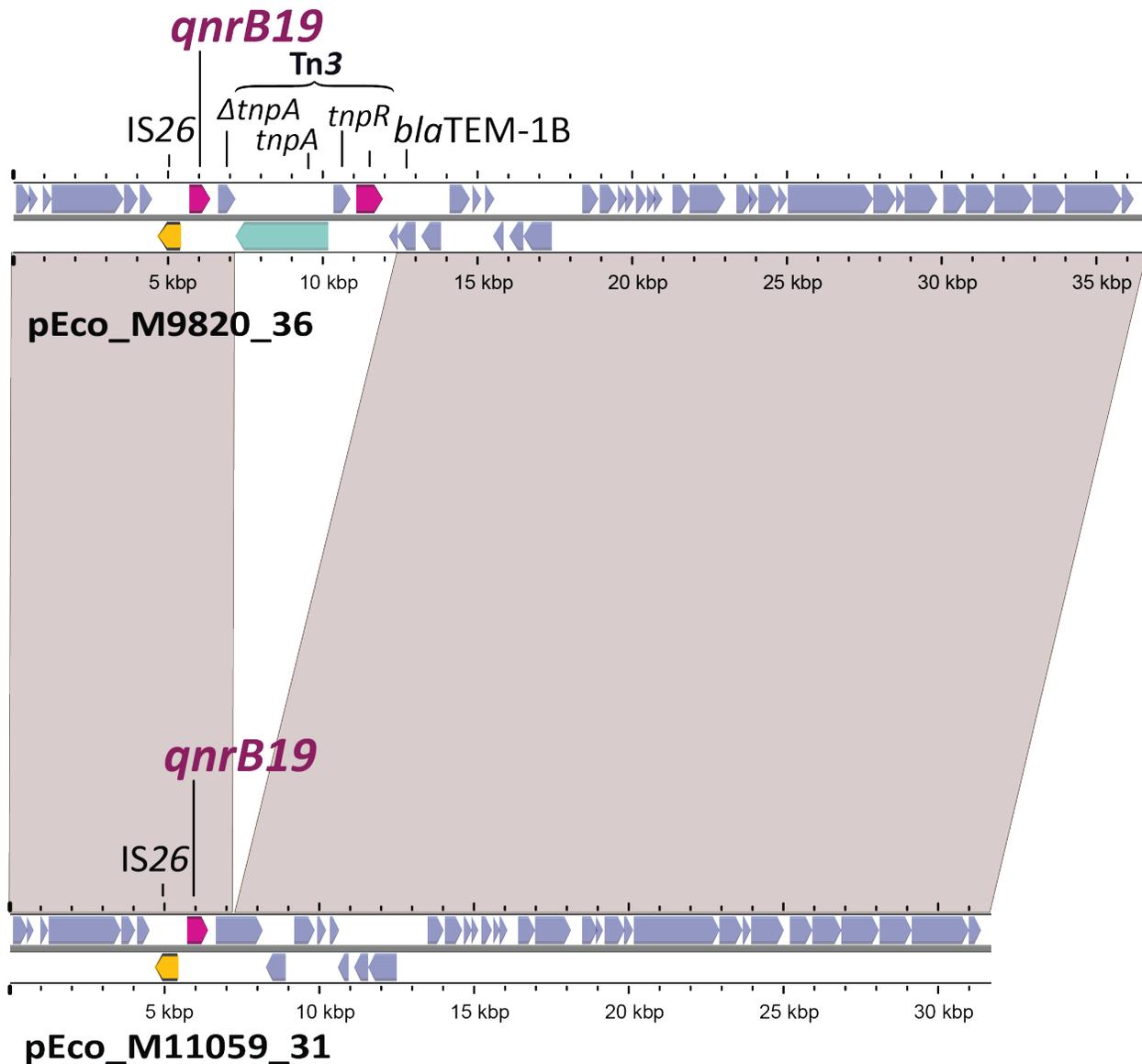


Figura 66. Comparación entre los plásmidos pEco_M9820_36 y pEco_M11059_31 portadores de *qnrB19*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y en amarillo las copias de IS26. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris.

Por otra parte, el plásmido pKpn_Q2108_343 difirió ampliamente de los dos anteriores, con un tamaño 10 veces mayor (343.372 pb) y perteneciente al grupo H13. El porcentaje de IS fue mucho mayor (12,5%) y tuvo dos copias de IS26. El entorno genético de *qnrB19* también fue diferente de los dos plásmidos con *qnrB19* mencionados anteriormente, pEco_M9820_36 y pEco_M11059_31, ya que en pKpn_Q2108_343 el gen *qnrB19* se localizó en un Tn5387 descrito previamente.⁹⁶ Fue el único plásmido de la plasmoteca que tuvo un Tn1331 completo con sus

genes de RAM asociados: *blaOXA-9*, *blaTEM-1A*, *aac(6')-Ib*, y *aadA1*. También se identificó al gen *blaCTX-M-2*, en los remanentes de un ICC1 localizado adyacentemente al sistema CRISPR-Cas ya mencionado en sección 5.05 - g y a *rmtD*, asociado a una *ISCR14* y a su vez clivado por una de las dos copias de *IS26*.

Como se analizó en la sección 5.05 - g, el plásmido pKpn_Q2108_343 tuvo la particularidad de contener al sistema CRISPR-Cas tipo IV, con 21 repeticiones directas, y 21 espaciadores. Estos sistemas se localizan frecuentemente en plásmidos o EGMs y generalmente en megaplásmidos (>200 kb) con los mismos replicones de pKpn_Q2108_343.⁵³

Los trabajos previos realizados por nuestro grupo^{74, 83, 83, 94} y por otros grupos de trabajo^{84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,91, 92, 93, 95, 96, 97}, así como los descritos en esta tesis, en conjunto demuestran que *qnrB19* se localiza en tres entornos genéticos bien diferentes, asociado a distintas plataformas genéticas y EGMs que serían responsables de su movilización y diseminación por distintos países de América y Europa. Este hecho constituye una diferencia muy relevante con respecto a lo observado en otros alelos *qnrB*, como *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB10* y *qnrB52*, en donde los plásmidos portadores de cada uno de estos alelos, mostraron un entorno genético en común para los mismos. Así, *qnrB19* se encontró en i) plásmidos tipo ColE1 de 2,7 a 7 kb (no conjugativos, pero sí movilizables) y sin estar asociado a ningún EGM conocido; ii) en transposones derivados de *ISEcp1* o *ISEcp1C*, como Tn2012^{95,96,97} también descrito en esta tesis (pKpn_Q2108_343); y iii) en los dos entornos genéticos muy similares, asociados a *IS26*, que se describen por primera vez en este trabajo: pEco_M9820_36 y pEco_M11059_31. Esta multiplicidad de plataformas genéticas demuestra la alta capacidad de diseminación de *qnrB19* y explica su localización en una gran variedad de tamaños de plásmidos, desde los más pequeños tipo ColE1, hasta un megaplásmido de 343 kb (pKpn_Q2108_343).

(h) *qnrS1*

Tres plásmidos de la plasmoteca contenían *qnrS1*: pKpn_M9167_86 (86.076 pb), pKox_M11007_87 (87.693 pb) y pKpn_M9932_55 (55.550 pb), todos fueron conjugativos.

Los plásmidos pKpn_M9167_86 y pKox_M11007_87 pertenecieron al grupo F, pero sus replicasas mostraron un 81.3% de identidad con la referencia de la base de datos de PlasmidFinder identificada como FII(pCRY). El plásmido pKpn_M9167_86 estuvo un 94% contenido en pKox_M11007_87 con un 99.99% de identidad. El 6% de cobertura faltante se debió a un fragmento adicional en pKpn_M9167_86 que contiene *IS6100* e *IS26*, con otros genes (fragmento 1 en Figura 67). Por otra parte, pKox_M11007_87 contiene un segmento extra que no comparte con pKpn_M9167_86 en el que se identificó *ISPa38* con otros genes (fragmento 2 en Figura 67). Además, ambos plásmidos contenían los mismos genes adicionales de RAM: *sul1*, *tet(A)*, *bla_{LAP-2}* y *dfrA1*.

En NCBI-BD (diciembre 2022) no se encontró ningún plásmido con una cobertura mayor al 84% para pKpn_M9167_86, ni 77% para pKox_M11007_87. La principal diferencia con las secuencias encontradas en NCBI-BD se debe a la región en la que ambos plásmidos contienen el gen *qnrS1*. El entorno genético de *qnrS1* en pKpn_M9167_86 y pKox_M11007_87 está comprendido por una *ISKpn19* río arriba del gen, y río abajo se encuentran 3 ORFs, seguidos por la β -lactamasa *bla*_{LAP-2} y un fragmento del gen *ftsI*¹⁴⁸. Ambos genes *qnrS1* y *bla*_{LAP-2} se reportaron como parte de una probable unidad movilizable, que provendría de un mismo ancestro^{148, 149}

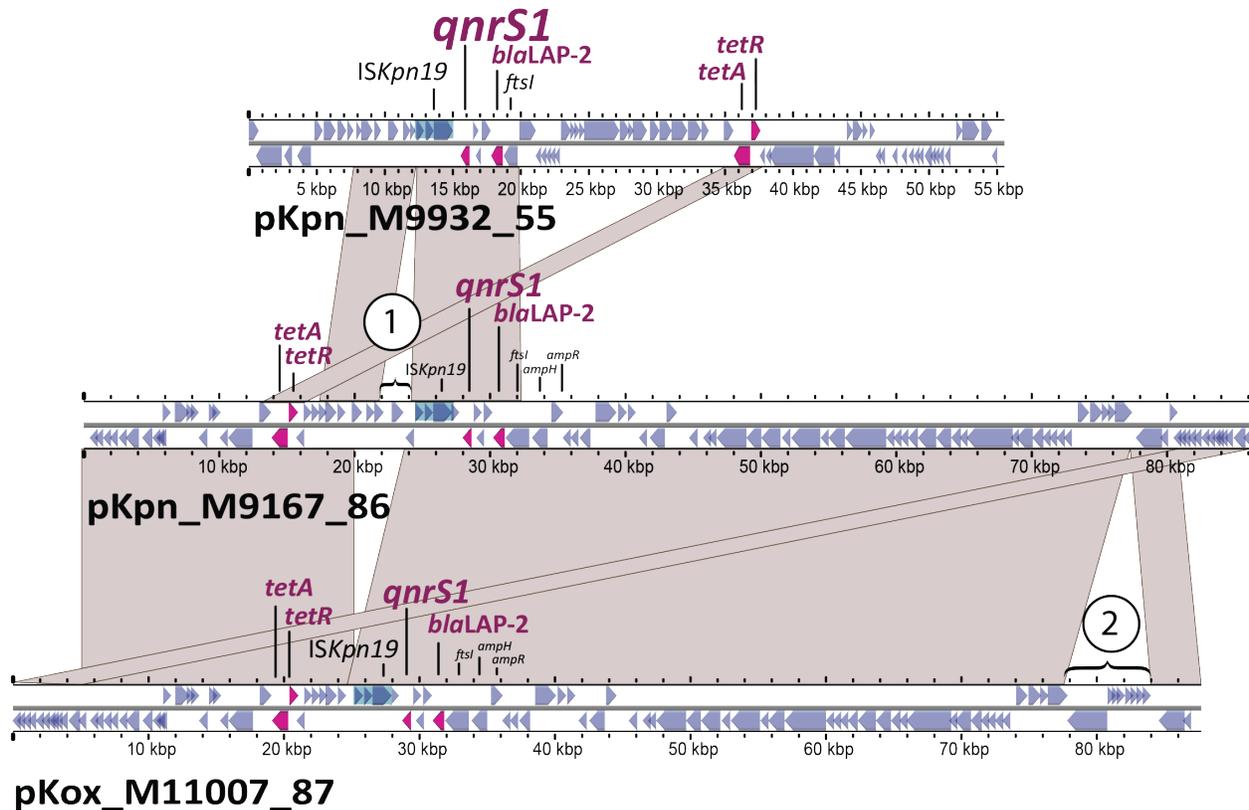
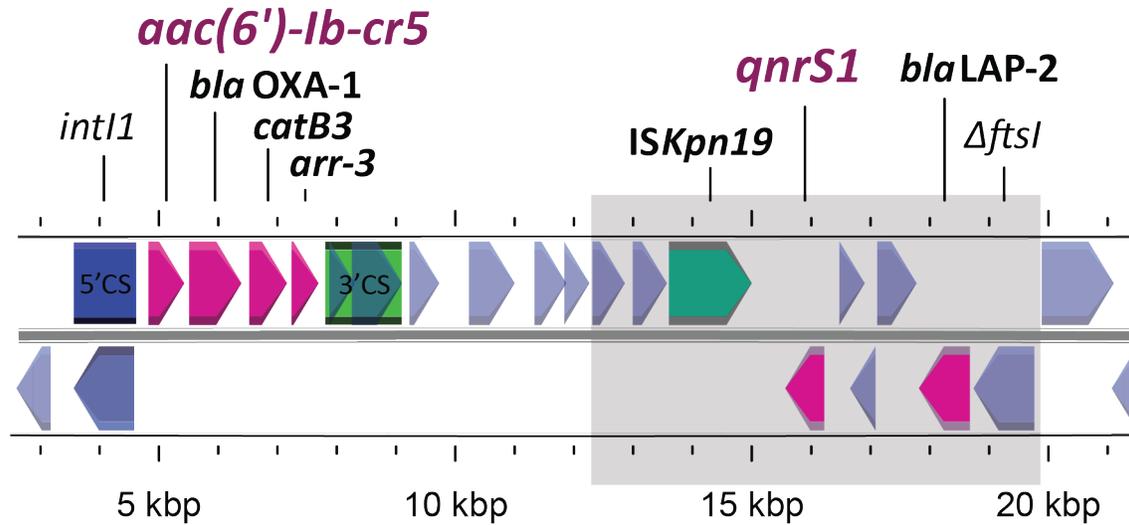


Figura 67. Comparación de los plásmidos portadores de *qnrS1*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y en amarillo las copias de IS26. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras grises se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98%. Los fragmentos 1 y 2 mencionados en el texto están resaltados con un círculo blanco y la secuencia correspondiente con un corchete.

Por otra parte, el tercer plásmido portador de *qnrS1*, pKpn_M9932_55, perteneció al grupo N por lo que no mostró identidad con los plásmidos mencionados anteriormente, a excepción del gen *qnrS1* y su entorno genético. La región de identidad entre los tres plásmidos comprendió *ISKpn19*, *qnrS1*, 3 ORFs, *bla*_{LAP-2} y *ftsI* que se encontró truncado en pKpn_M9932_55 (Figura 67). Cabe destacar que la región entre *ISKpn19* y *qnrS1* de pKpn_M9932_55 tenía un fragmento que contenía un ORF con alta identidad con *hin* el cual codifica para una posible invertasa. En el alineamiento de los tres plásmidos portadores de *qnrS1* no fue posible localizar un EGM responsable de la movilidad de este PMQR (Figura 68). Además de *qnrS1* y *bla*_{LAP-2},

pKpn_M9932_55 contenía *tet(A)* y otros genes de RAM localizados en la *vr-1* de un integrón simple: *aac(6')-Ib-cr5*, *bla_{OXA-1}*, *catB3* y *arr-3*. Este arreglo de casetes es el mismo que se encuentra en *In37::ISCR1::qnrB10*, uno de los ICC1 que contiene *qnrB10*.



pKpn_M9932_55

Figura 68. Entorno genético de los genes *qnrS1* y *aac(6')-Ib-cr5* del plásmido pKpn_M9932_55. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, 3'CS en verde. En sombra gris se detalla el fragmento que se encontró en común y con alta identidad entre los tres plásmidos portadores de *qnrS1*.

(i) *qnrE1*

En la plasmoteca, se identificaron tres plásmidos con *qnrE1*: pKpn_Q1130_193 (193.854 pb), pKva_M9257_90 (90.347 pb) y pKpn_M21692_102 (102.193 pb). Los primeros dos se transfirieron por conjugación, mientras que el último no pudo ser transferido, a pesar de reiterados intentos.

El plásmido pKpn_Q1130_193, se obtuvo del aislamiento *K. pneumoniae* Q1130 del cual se describió por primera vez la familia *qnrE*.³⁶ Si bien se había descrito y publicado el entorno del gen *qnrE1*, no se había caracterizado en su totalidad el plásmido. pKpn_Q1130_193 perteneció al grupo F, con las replicasas FIB(K) y FII(K). Contenía un integrón simple con el casete *aadA1*, y los genes *dfrA8*, *tet(D)*, *bla_{SHV-2}*, *bla_{SCO-1}*, *bla_{TEM-1A}*, y *aac(3)-IIa* en regiones con abundantes copias de IS26. El gen *qnrE1* se encontró asociado a *ISEcp1* y a los genes *araJ* y *ahp*, del entorno cromosómico del cual provenía *qnrE1* (Figura 69).

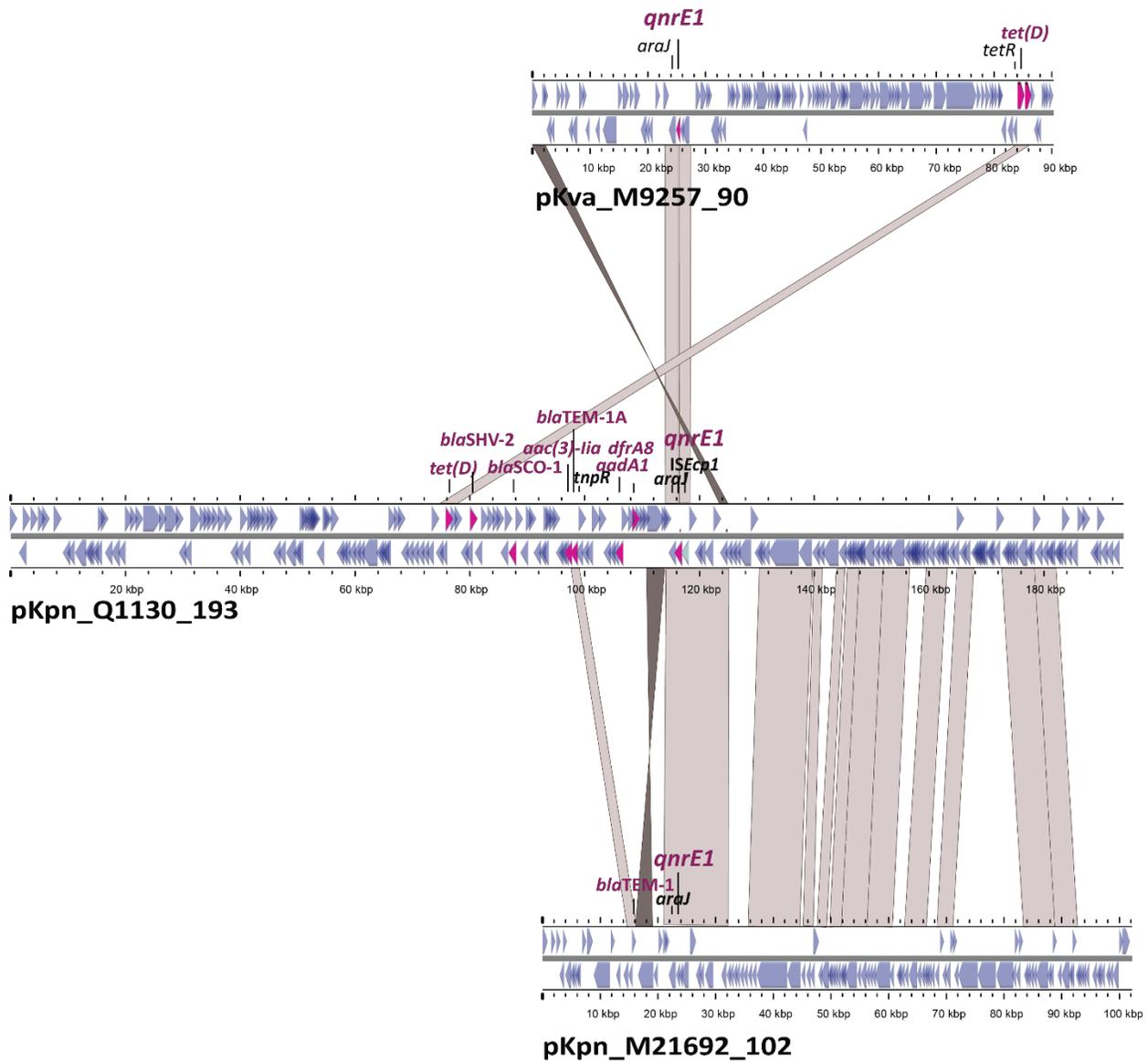


Figura 69. Comparación entre todos los plásmidos portadores de *qnrE1*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris claro aquellas con orientación directa y en gris oscuro con orientación complementaria.

El plásmido pKva_M9257_90 también perteneció al grupo F, pero contenía otra replicasa: FII(pSFO). El alineamiento entre pKpn_Q1130_193 y pKva_M9257_90, demostró que casi no existe identidad entre los plásmidos, compartiendo únicamente una región que contenía a *qnrE1* (Figura 69). Este plásmido también contenía el gen de RAM *tet(D)*.

Por último, el plásmido pKpn_M21692_102 también perteneció al grupo F, pero sólo se identificó la replicasa FII(K). El entorno de *qnrE1* fue muy similar a los de los otros dos plásmidos

portadores de este gen, y el único gen de RAM, además de *qnrE1*, fue *bla*_{TEM-1B}. El alineamiento con pKpn_Q1130_193, demostró que pKpn_M21692_102 estaba contenido en el primero en un 59% (99,3% de identidad), compartiendo varias regiones, pero separadas por fragmentos sin identidad (Figura 69).

En el trabajo donde describimos por primera vez *qnrE1*, observamos que este gen estaba contenido en un transposón derivado de *ISEcp1* (se denominará TnQ1130), responsable de la movilización de este gen desde el cromosoma de *Enterobacter* spp.³⁶ A fin de analizar si en los otros dos plásmidos portadores de *qnrE1*, pKva_M9257_90 y pKpn_M21692_102, este gen también estaba contenido en transposones derivados de *ISEcp1*, se realizó un análisis más profundo de las regiones flanqueantes a *qnrE1*. Cabe recordar que, en la transposición de *ISEcp1*, la transposasa es capaz de reconocer IRR alternativos, es decir, secuencias de 14 bases que pueden tener hasta un mínimo de 3 a 6 identidades con el IRR canónico.^{150, 151} Esta característica es responsable de la captura y movilización de la región adyacente al IRR de *ISEcp1*, que queda limitada en el otro extremo por el IRR alternativo. Por lo tanto, para definir y comparar las estructuras de los posibles transposones derivados de *ISEcp1* que contenían *qnrE1* en pKva_M9257_90 y pKpn_M21692_102 (se denominarán TnM9257 y TnM21692, respectivamente), se compararon las regiones flanqueantes a ese gen, delimitadas por el IRR de *ISEcp1* (río arriba de *qnrE1*) y por el final de *Δahp* (río abajo de *qnrE1*), es decir, el límite de la región con alta identidad con el cromosoma de *Enterobacter* spp. en el cual *ISEcp1* habría capturado a *qnrE1* (Figura 70). Además, en esta comparación también se incluyó a pKp41M (70.377 pb), un plásmido del grupo IncM1 descrito en Brasil, con *qnrE1* también flanqueado por *ISEcp1* (este posible transposón se denominará TnKp41).¹⁰⁰

Las regiones flanqueantes de *qnrE1* en TnM21692, incluyendo el IRR alternativo (IRR1), fueron idénticas a las de TnQ1130, lo cual indicó que ambos correspondían a un mismo transposón de 4062 pb. Más aún, debido a que los plásmidos pKpn_Q1130_193 y pKpn_M21692_102, estaban altamente relacionados, este transposón estaba contenido en sendas regiones de 9403 pb, idénticas entre sí.

Para TnM9257 y TnKp41 se encontraron IRRs alternativos (IRR2 e IRR3, respectivamente) diferentes a IRR1 que tenían 5/14 y 9/14 identidades, respectivamente con respecto al IRR canónico de *ISEcp1*. Además, se encontraron sendos TSDs de 5 pb y ricos en A y T, lo cual es característico de las transposiciones de *ISEcp1* (Figura 70). Por lo tanto, las longitudes de TnM9257 y TnKp41 fueron de 4803 y 4103 pb, respectivamente.

En TnM9257, la región flanqueante río arriba de *qnrE1* fue de 174 pb e idéntica a la de TnKp41, mientras que en TnQ1130/TnM21692 esta región fue de solo 22 pb. Sin embargo, este fragmento de 22 pb fue idéntico a su correspondiente en TnM9257. Estos resultados son coherentes con la posibilidad de que los eventos de captura y movilización de *qnrE1* hayan estado mediados por al menos dos inserciones de *ISEcp1* en el cromosoma de *Enterobacter* spp.,

separadas por 152 pb, que dieron origen a las estructuras presentes en TnM9257, TnKp41 y TnQ1130/TnM21692.

Las regiones flanqueante río abajo de *qnrE1* tuvieron secuencias idénticas, pero longitudes distintas en TnM9257 (más larga), TnQ1130/TnM21692, y TnKp41 (más corta), debido a deleciones crecientes, en este orden, ocurridas en el gen *ahp* (Figura 70).

Para explicar la formación TnM9257, TnQ1130/TnM21692 y TnKp41, se podría proponer la ocurrencia de tres eventos independientes de captura/movilización de *qnrE1* desde el cromosoma de *Enterobacter* spp.. Sin embargo, no es posible descartar que TnM9257 y TnKp41 hayan sido generados por un único evento inicial sobre el cromosoma de *Enterobacter* spp., que produjo TnM9257, seguido de un segundo evento de captura/movilización sobre este último, en el cual se utilizó el IRR3 para la transposición de *ISEcp1*, generando TnKp41. Además de *qnrE1*, en la bibliografía internacional ya se describieron otros casos de captura/movilización de genes de RAM, mediados por *ISEcp1*.^{151, 152, 153}

Como conclusión, *qnrE1* se moviliza mediante transposones derivados de un único EGM (*ISEcp1*), si bien las variantes circulantes en Argentina y otros países pueden haber tenido orígenes diferentes, y estos transposones pueden ser adquiridos por diferentes grupos de plásmidos.

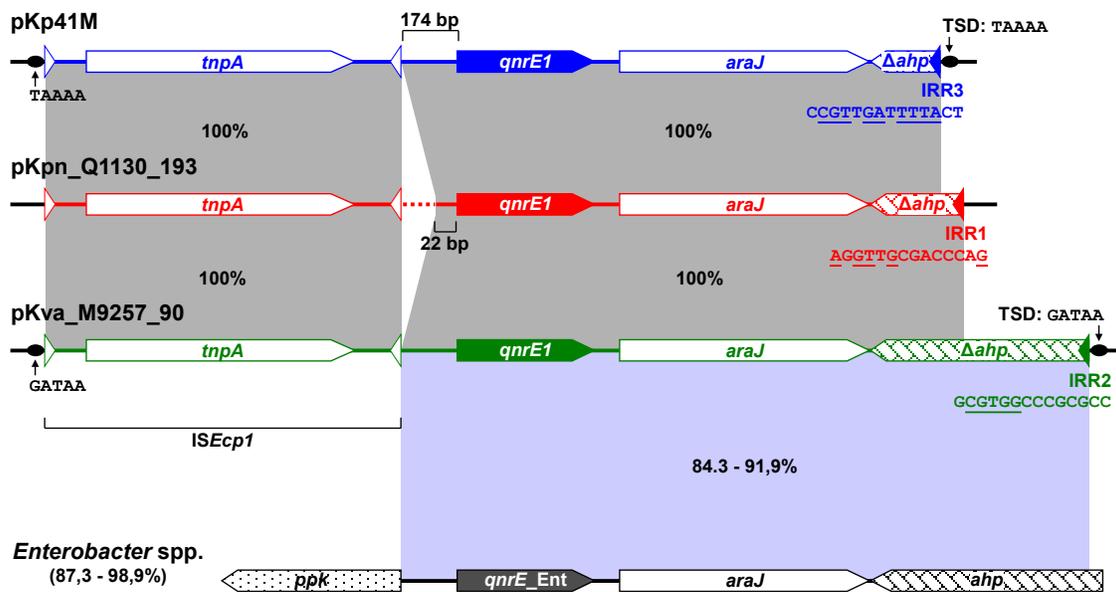


Figura 70. Comparación de los transposones derivados de *ISEcp1* que contienen *qnrE1*. En la parte superior de la figura, se representan las regiones de los plásmidos pKp41M (reportado en Brasil,¹⁰⁰ pKpn_Q1130_193 y pKva_M9257_90 (incluidos en esta tesis) que contienen transposones derivados de *ISEcp1* con *qnrE1*: el de pKp41M (4103 pb) se representa en color azul; TnQ1130 (4062 pb) y TnM9257 (4803 pb), en rojo y verde, respectivamente (TnM21692, contenido en el plásmido pKpn_M21692_102, fue idéntico a TnQ1130). Los triángulos vacíos indican IRL (izquierda) e IRR (derecha) de *ISEcp1*, y los triángulos llenos, los IRR alternativos, IRR1, IRR2 e IRR3, para los que se indican sus respectivas secuencias (las bases idénticas a las del IRR canónico de *ISEcp1* están subrayadas). Los óvalos

negros indican las secuencias duplicadas (TSD). Las regiones entre los IRRs y los genes *qnrE1* no están a escala (se indica su longitud con corchetes horizontales), y la línea punteada, en la región de TnQ1130, indica un *gap* de 152 pb introducido para permitir el alineamiento. Las deleciones de *ahp* en TnM9257, TnQ1130 y el transposón de pKp41M fueron de 65, 654 y 765 pb, respectivamente. Las áreas grises indican las regiones idénticas entre los tres transposones. La estructura en la parte inferior de la figura, denominada *Enterobacter* spp., representa una secuencia consenso de 4061 pb, de las regiones cromosómicas de *E. asburiae* L1, *E. asburiae* CAV1043, *E. cloacae* MBRL1077 y *E. asburiae* ENIPBJ-CG1, que contenían los alelos cromosómicos de *qnrE1* (se indican como “*qnrE_Ent*”). Estas cuatro regiones comprenden desde el extremo 3' de *ppk* (codifica para una polifosfato kinasa) hasta el 5' de *ahp* (codifica para una alquil hidropoxidasa), y el rango del porcentaje de identidad de las comparaciones pareadas entre las mismas se indica abajo de *Enterobacter* spp.. El área azul muestra la región de alta identidad entre TnM9257 y las cuatro regiones de *Enterobacter* spp. (se indica el rango del porcentaje de identidad de las comparaciones pareadas).

(j) *aac(6')-Ib-cr*

En la plasmoteca se identificaron 22 plásmidos con *aac(6')-Ib-cr*. Se describieron diferentes alelos para este gen, y existen al menos dos nomenclaturas para denominarlos: la propuesta por Quiroga y col.¹⁰⁴ y la utilizada por la herramienta AMRFinder Plus. Dado que esta herramienta se utilizó para todos los genes de RAM en esta tesis, se siguió su criterio de nomenclatura para nombrar los diferentes alelos de *aac(6')-Ib-cr*.

En 10 de los 22 plásmidos con *aac(6')-Ib-cr*, este gen se encontró con otros PMQR, incluyendo *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB10*, *qnrB52*, y *qnrS1* (Tabla 12).

Los plásmidos portadores de *aac(6')-Ib-cr* se agruparon en cuatro estructuras ya descritas de acuerdo a la localización de este gen⁷⁴: *i*) Derivados del Tn6238; *ii*) como casetes de integrones de clase 1 (simples o ICC1); *iii*) en integrones twin; y *iv*) en estructuras flanqueadas por IS26.

(i) *aac(6')-Ib-cr* en Tn6238

El Tn6238 fue identificado por primera vez en Argentina, su estructura corresponde a un derivado de un Tn1331 en el cual la acetilasa AAC(6')-Ib tiene las mutaciones W87R y D164Y resultando en la enzima bifuncional AAC(6')-Ib-cr⁷. Se identificaron ocho plásmidos que tenían regiones con alta identidad con Tn6238. En cinco de los ocho plásmidos se encontró la secuencia de Tn6238 completa: pSma_M9684_342, pEko_M9921_354, pMmo_M9272_46, pEcl_Q3039_36 y pEcl_Q5005_56. En este último el Tn6238 estaba interrumpido por una inserción de ISKpn15.

Dos plásmidos portadores de esta estructura tienen gran tamaño, pSma_M9684_342 (342.804 pb) y pEko_M9921_354 (354.216 pb) (Figura 71). Ambos plásmidos pertenecen al grupo HI, fueron muy similares entre sí (ver alineamiento en Figura 62) y poseen alta proporción de IS, con 10,6-13,5%, y una densidad de 8,5-11,3 IS/10⁵ pb. En cambio, pMmo_M9272_46 fue de menor tamaño (46.408 pb) y tuvo una proporción de sólo 0,58% de IS, con una densidad de 2,1 IS/10⁵ pb. Este plásmido no perteneció a ningún grupo identificable por PlasmidFinder y su Tn6238, tuvo el alelo *aac(6')-Ib-cr5*, en lugar de *aac(6')-Ib-cr7* encontrados en los otros siete

plásmidos. La comparación con NCBI-BD (diciembre 2022) mostró identidad con sólo 5 plásmidos, todos obtenidos de aislamientos de *M. morgani*. La cobertura fue de 78-94%, con 96,8-99,9% de identidad para pMmo_M9272_46. Cuatro de estos plásmidos fueron secuenciados en China, y uno en República Checa y ninguno de ellos contiene el Tn6238 o derivados de este. Tampoco se encontraron publicaciones asociadas a estas secuencias. El cuarto plásmido que contenía Tn6238 completo, pEcl_Q3039_36 (36.531 pb) tuvo una replicasa única en la plasmoteca, identificada como pKPC-CAV1193 y su contenido de IS fue similar al de pMmo_M9272_46 (0,74% y densidad de 2,7 IS/10⁵ pb).

Tabla 12. Plásmidos portadores de *aac(6')-Ib-cr*

Plásmido	TC	Longitud (pb)	Gen	Entorno	Grupos de plásmidos	Otros genes RAM
pEae_M9518_55	TC-M23227	55248	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	ICC1	N	<i>catB3, blaOXA-1, blaCTX-M-2, arr-3</i>
pKpn_Q3094_56	TC-M23384	56682	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	ICC1	N	<i>catB3, blaOXA-1, blaCTX-M-2, arr-3</i>
pKva_M7943_60	TC-M23825	60263	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	ICC1	N	<i>qnrB10, catB3, blaOXA-1, arr-3 qnrB52, floR, aadA16, dfrA27, tet(A), arr-3, mph(A), bleO</i>
pKqsq_M17277_123	TC-M25207	123307	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	ICC1	F	<i>qnrB10, catB3, blaOXA-1, blaCTX-M-2, arr-3, dfrA8, ere(A) qnrB10, catB3, blaOXA-1, blaCTX-M-2, arr-3</i>
pKpn_M9314_63	TC-M23667	63400	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Integron twin	N	<i>qnrS1, catB3, blaOXA-1, blaLAP-2, tet(A), arr-3</i>
pCfr_Q4143_61	TC-M11222	61205	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Integron twin	N	<i>catB3, blaOXA-1, arr-3</i>
pKpn_M9932_55	TC-M23090	55550	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Integron Simple	N	<i>catB3, blaOXA-1, arr-3</i>
pKox_Q3108_43	TC-M23097	43268	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Integron Simple	N3	<i>catB3, blaOXA-1, tet(A), arr-3</i>
pEco_Q1187_50	TC-M23337	50078	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Integron Simple	N	<i>catB3, blaOXA-1, tet(A), arr-3 qnrB2, blaTEM-1B, blaOXA-1, blaCTX-M-15, dfrA25, tet(A) blaOXA-1, blaCTX-M-15, aac(3)-IIE, tet(A) qnrB1, catB3, blaTEM-1B, blaOXA-1,</i>
pEco_M9902_127	TC-M9979	127921	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Flanqueado por IS26	N - FII	
pKpn_M9306_90	TC-M23172	90069	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Flanqueado por IS26	F	
pKpn_M9863_197	TC-M23404	183544	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Flanqueado por IS26	F	

Resultados Objetivo II - Análisis de los entornos genéticos de PMQRs y plásmidos portadores

pKpn_M9828_138	TC-M23438	138475	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Flanqueado por IS26	FII - R	<i>blaCTX-M-15, aac(3)-Iia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, dfrA14 blaOXA-1, blaCTX-M-15, aac(3)-Iia, tet(C) qnrB1, blaOXA-1, blaOXA-567, aac(3)-Ile, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, dfrA14, tet(A), msr(E), mph(E) aadA1, dfrA25, tet(A) qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, blaPER-2, aac(6')-Ib', aadA1</i>
pKpn_M21014_175	TC-M21217	175492	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Flanqueado por IS26	C	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pEco_Q4134_62	TC-M23338	62305	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238-like	N - U	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pEko_M9921_354	TC-M23665	354216	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238	HI	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pMmo_M9272_46	TC-M23153	46408	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	Tn6238	No tipable	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pSma_M9684_342	TC-M23252	342804	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238	HI	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pEcl_Q3039_36	TC-M23125	36531	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238	pKPC-CAV1193	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pKpn_M21692_150	-	150550	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238-like	C	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pEcl_Q5005_56	TC-M23386	56338	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238-like	N	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>
pKpn_M9992_73	TC-M23408	73281	<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	Tn6238-like	M	<i>blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1 qnrB10, catA1, blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1</i>

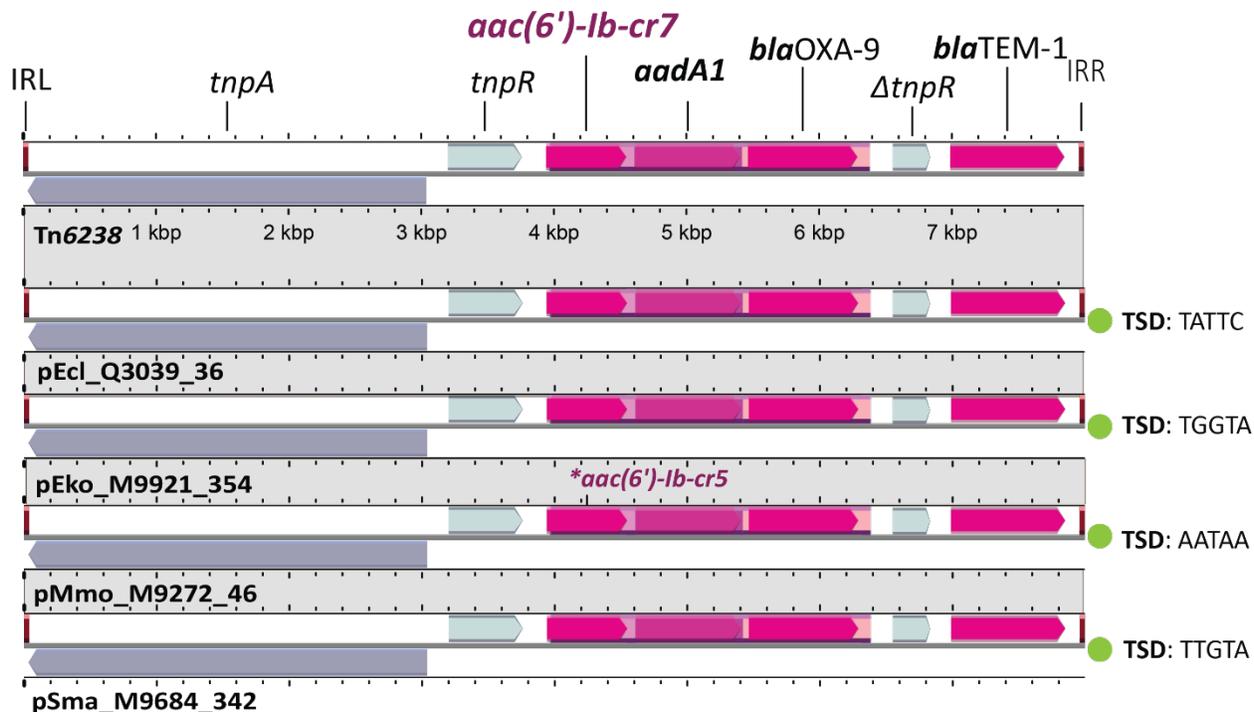


Figura 71. Tn6238 encontrados en los diferentes plásmidos. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los Tn6238, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. En barras grises entre las secuencias se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% con orientación directa. Los genes de RAM se colorearon en magenta. En todos los casos se encontró el TSD y se detalla la secuencia a la derecha. Se resalta con un asterisco al plásmido pMmo_M9272_46 porque es el único que contiene al Tn6238 portando *aac(6')-Ib-cr5*.

El quinto plásmido con Tn6238 completo, pEcl_Q5005_56 (56.338 pb), tuvo una inserción de *ISKpn15* en la región intergénica, entre el *tnpR* y la *aac(6')-Ib-cr7*. Su replicasa fue distinta a la de los cuatro plásmidos mencionados anteriormente, perteneciendo al grupo N. Cabe destacar, que el Tn6238 se encontró insertado dentro de *tet(A)*, y se identificó un TSD para esta inserción. (Figura 72). Este plásmido, también posee un integrón simple con un gen *dfrA25* en forma de casete.

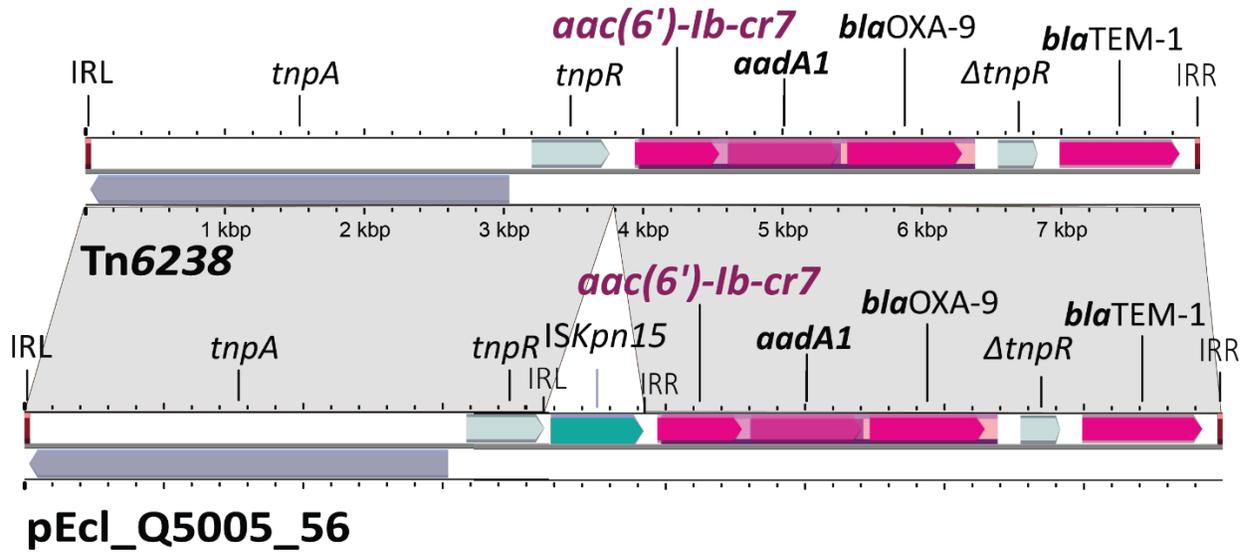


Figura 72. Alineamiento de pEcl_Q5005_56 con Tn6238. Las líneas grises se representan la secuencia del Tn6238 y se compara con la del pEcl_Q5005_56. Por arriba y debajo de las líneas grises se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y a la *ISKpn15* en verde. En barras grises se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98%.

Los tres plásmidos restantes que tenían alta identidad con regiones del Tn6238, contuvieron sólo fragmentos de este transposón, por lo cual se denominan Δ Tn6238.

El plásmido pKpn_M21692_150 (150.550 pb) es otro de los dos plásmidos con PMQRs que contenía el aislamiento clínico *K. pneumoniae* M21692. Este plásmido del grupo C portaba el alelo *aac(6')-Ib-cr7* y no se pudo transferir mediante conjugación. Este gen se encontró en un Δ Tn6238, que tenía una delección de 1.762 pb inmediatamente después de *aac(6')-Ib-cr7*, e incluyó a los genes *aadA1* y *blaOXA-9*, aunque se conservó *blaTEM-1* e *IRR* (Figura 73). Como se puede ver en la Tabla 12, este plásmido contenía diversos genes de RAM (*blaOXA-163*, *msr(E)*, *mph(E)*, *floR*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* y *tet(A)*) confiriendo resistencia a múltiples drogas.

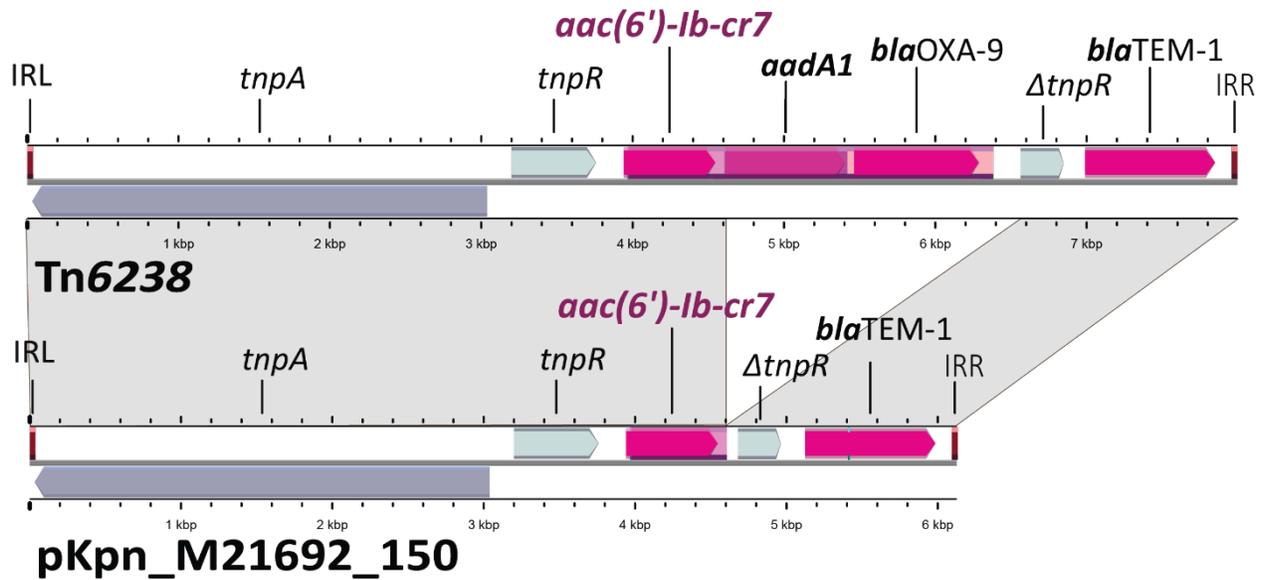


Figura 73. Alineamiento de Tn6238 con pKpn_M21692_150. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de los Tn6238. Por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% con orientación directa. Los genes de RAM se colorearon en magenta. En pKpn_M21692_150 el Tn6238 se encontró con una deleción de los casetes *aadA1* y *bla*_{OXA-9}.

El segundo plásmido con Δ Tn6238, pKpn_M9992_73 (73.281 pb) fue el único de la plasmoteca que perteneció al grupo M1 y tuvo una baja proporción de IS, con 0,7% y de densidad 2,7 IS/10⁵ pb. Dentro del Δ Tn6238 se insertó un transposón compuesto que no fue descrito previamente y que contenía *bla*_{PER-2} flanqueada por dos copias de *ISPa12* con su TSD. Además, este Δ Tn6238 tuvo una deleción de 1.096 pb, que correspondió a *bla*_{TEM-1A} y al IRR (Figura 74).

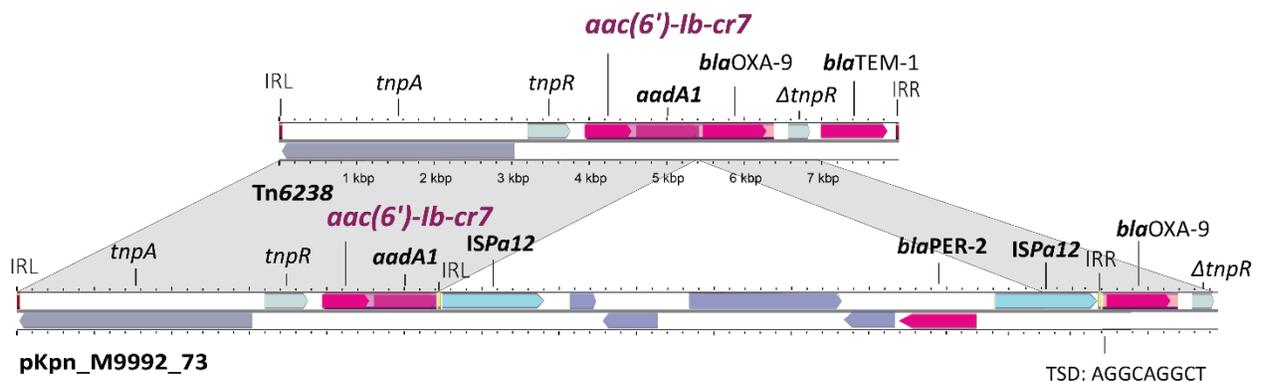


Figura 74. Alineamiento del Tn6238 con pKpn_M9992_73. Las líneas grises gruesas representan las secuencias del Tn6238, por arriba y abajo se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. En barras grises se representan las regiones con una identidad mayor al 98%. Se encontraron fragmentos del Tn6238 en pKpn_M9992_73 interrumpidos por otro transposón compuesto portador de *bla*_{PER-2} flanqueada por dos copias de *ISPa12* con su TSD y con una deleción de 1.096 pb, que correspondió a *bla*_{TEM-1A} y al IRR.

Por último, el tercer plásmido con Δ Tn6238, pEco_Q4134_62 (62.305 pb) fue un plásmido híbrido con las replicasas de los grupos N y U. Se identificó el gen *aac(6')-Ib-cr7* en un Δ Tn6238, que tenía una deleción de 2.465 pb que incluyó al *bla_{OXA-9}*, Δ *tnpR*, *bla_{TEM-1}* e IRR. Además, el *tnpA* del Δ Tn6238 se encontró interrumpido por *ISKpn9* con su TSD. Adyacente a la deleción de esta estructura se encontró una IS26 que probablemente haya sido la responsable de la misma, que modificó el plásmido ancestral que contenía el Tn6238 completo. El plásmido pEco_Q4134_62 contiene además del PMQR, el gen *tet(A)* y un integrón simple con el gen *dfrA25* como casete (Figura 75).

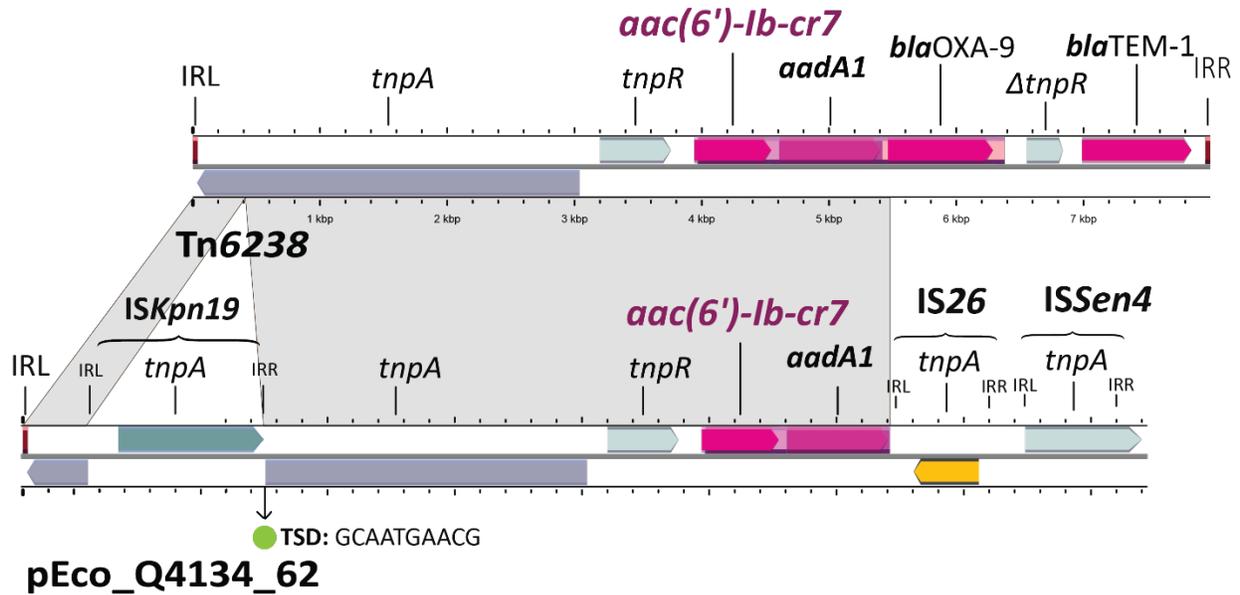


Figura 75. Alineamiento de Tn6238 con pEco_Q4134_62. Las líneas grises gruesas representan las secuencias del Tn6238, por arriba y abajo se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, la IS26 en color amarillo. En barras grises entre las secuencias se representan las regiones con una identidad mayor al 98%. Se encontró en pEco_Q4134_62 un fragmento del Tn6238 interrumpido por una *ISKpn19*, además de una deleción de los genes *bla_{OXA-9}* y *bla_{TEM-1}* posiblemente debido a rearrreglos mediados por IS26 y/o *ISSen4*.

Los ocho plásmidos con Tn6238/ Δ Tn6238 se aislaron de seis especies de Enterobacteriales (*E. kobei*, *M. morgani*, *S. marcescens*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*), y pertenecieron a grupos de plásmidos muy diferentes (HI, N, híbrido N/U, M1, C y pKPC-CAV1193) incluyendo uno no tipificable. Estos resultados constituyen evidencia de que Tn6238/ Δ Tn6238 sería una plataforma muy eficiente para la movilización de *aac(6')-Ib-cr* a través de diferentes especies y grupos de plásmidos, incrementando la resistencia a otros antibióticos además de quinolonas.

(ii) *aac(6')-Ib-cr* en Integrones de clase 1

En nueve plásmidos *aac(6')-Ib-cr* se encontró en la región variable de integrones (IC1, ICC1 e integrones twin), detectándose solo el alelo *aac(6')-Ib-cr5*. En ocho de los nueve casos se observó la misma combinación de casetes de la vr-1 del In37::ISCR1::*qnrB10*: *aac(6')-Ib-cr5*,

*bla*_{OXA-1}, *catB3*, y *arr-3*, lo cual sugiere una mayor diseminación para este arreglo de casetes. En el plásmido restante (pKqsq_M17277_123) la *vr-1* encontrada fue: *aac(6')-Ib-cr5*, *arr-3*, *dfrA27* y *aadA16*. De los nueve casos, tres correspondieron a ICC1, cuatro a ICC1 y dos a integrones twin.

Los tres plásmidos con genes *aac(6')-Ib-cr5* en IC1s fueron: pKpn_M9932_55, pEco_Q1187_50 y pKox_Q3108_43. Los dos primeros plásmidos pertenecieron al grupo N y el tercero al subgrupo N3. El plásmido pKpn_M9932_55 también contenía *qnrS1* pero asociado a la estructura mencionada anteriormente que incluye *bla*_{LAP-2}. Estos tres plásmidos se compararon entre sí, para evaluar si existe alguna relación entre ellos. Los plásmidos pKpn_M9932_55 y pEco_Q1187_50 estuvieron muy relacionados entre sí (cobertura genética de 80% y 90%, uno con respecto al otro, y $\geq 99\%$ de identidad, Figura 76). Los integrones simples de estos plásmidos fueron casi idénticos difiriendo sólo en la región 5' de *aac(6')-Ib-cr5* que en el caso de pKox_Q3108_43 contenía 200 pb adicionales. Cabe aclarar que este polimorfismo de la región 5' de *aac(6')-Ib* y su variante *aac(6')-Ib-cr* ya ha sido previamente reportada.¹⁵⁴ El tercer plásmido pKox_Q3108_43 del subgrupo N3, casi no estaba relacionado con los dos anteriores, mostrando identidad sólo en la región que contenía al integrón simple (Figura 76).

En 4 plásmidos se encontró a *aac(6')-Ib-cr5* en la *vr-1* de ICC1. Tres de estos cuatro pertenecieron al grupo N, dos de ellos (pEae_M9518_55 y pKpn_Q3094_56) contenían *bla*_{CTX-M-2} en la *vr-2* como en In35¹⁵⁵, mientras que el tercero (pKva_M7943_60) tenía *qnrB10* en un In37::ISCR1::*qnrB10* (Figura 61). Los tres plásmidos fueron casi idénticos entre sí y ninguno de ellos contenía genes de RAM adicionales a los encontrados en sus respectivos ICC1.

El cuarto plásmido con *aac(6')-Ib-cr5* en un ICC1 (pKqsq_M17277_123) contenía *qnrB52* en su *vr-2*. Como se mencionó en la sección donde se describe este último gen, este plásmido pertenecía al grupo F, por lo cual sólo tenía en común con pEae_M9518_55, pKpn_Q3094_56 y pKva_M7943_60 las regiones conservadas del ICC1. El resto de las características de este plásmido ya se describieron en la sección de resultados correspondiente a *qnrB52*.

(iii) *aac(6')-Ib-cr5* en integrón twin

En dos plásmidos pKpn_M9314_63 y pCfr_Q4143_61 se encontró a *aac(6')-Ib-cr5* en la *vr-1* de integrones twin, es decir con dos copias de ISCR1. Estos resultados se detallan en la sección 5.06 - f de los plásmidos portadores de *qnrB10* en integrones twin. Además, se discute en la sección 5.07 - c un modelo que explicaría el origen de estos integrones.

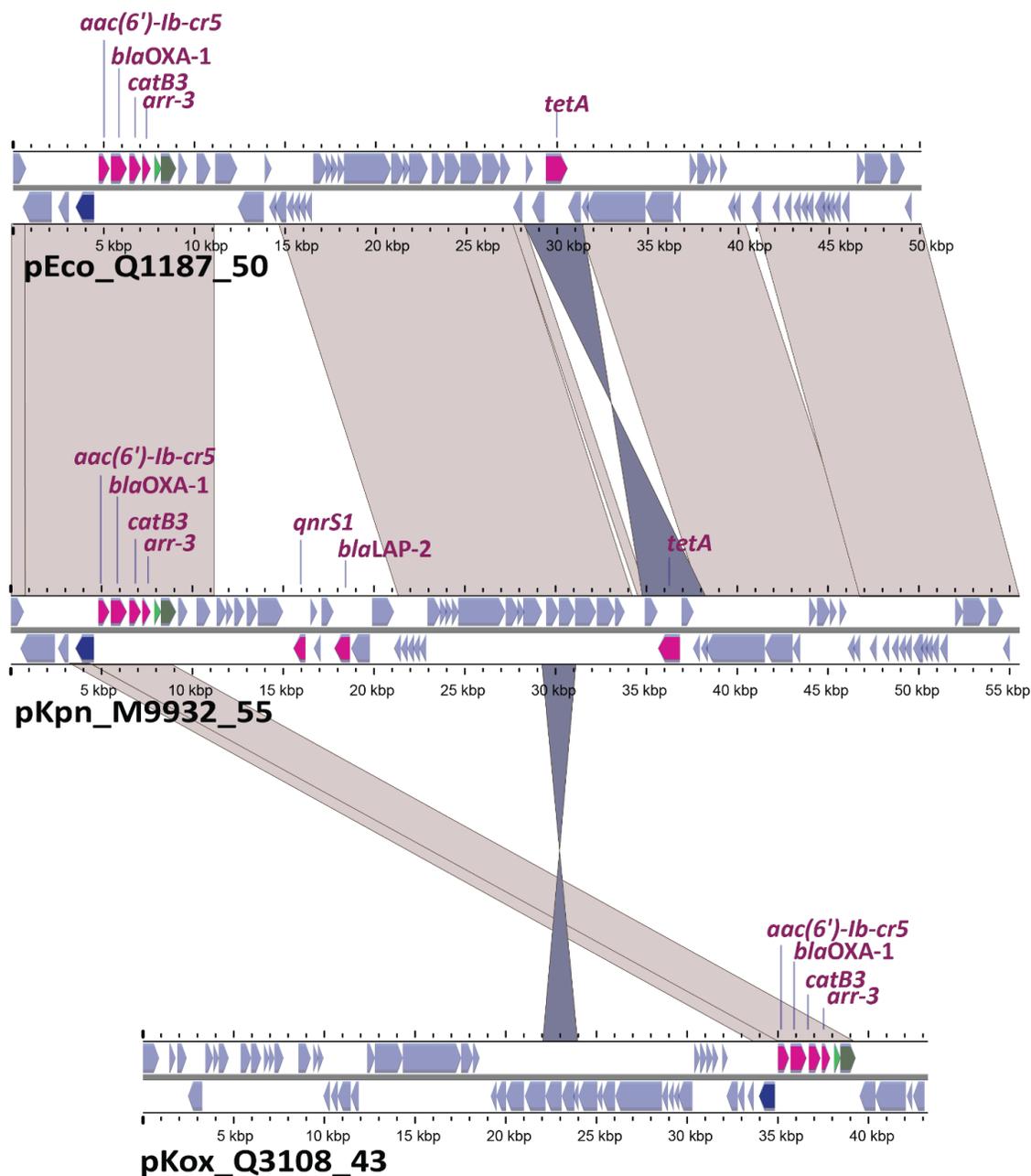


Figura 76. Alineamiento de los tres plásmidos portadores de *aac(6')-Ib-cr5* en integrón simple. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris claro aquellas con orientación directa y en gris oscuro con orientación complementaria.

(iv) *aac(6')-Ib-cr5* flanqueado por IS26

En cinco plásmidos el gen *aac(6')-Ib-cr5*, se encontró en una estructura 100% idéntica, compuesta por dicho gen, *bla_{OXA-1}*, y Δ *catB3* (delecionado en el extremo 3'). Esta estructura fue

100% idéntica a la región correspondiente de *vr-1* del *In37::ISCR1::qnrB10* (Figura 61 y Figura 77). Además, en cuatro de los cinco plásmidos pertenecientes a los grupos FII, C y los híbridos FII-N, y FII-R, esta estructura estuvo flanqueada por dos copias de IS26 en orientaciones invertidas, formando una estructura de 3.826 pb. En el plásmido restante, con las replicasas FIB(K) - FII(K), la estructura *aac(6')-Ib-cr5 /bla_{OXA-1}/ΔcatB3* estuvo flanqueada por una IS26 y otra IS similar a IS15, es decir una IS26 insertada dentro de otra IS26, resultando en un tamaño final de 4.450 pb. La estructura de 3.826 pb se comparó con la NCBI-BD (octubre 2022) y se encontraron 1335 entradas con 100% de cobertura y $\geq 98,7\%$ de identidad, correspondientes a diferentes especies de Enterobacterales y también de los géneros *Aeromonas*, *Leclercia* y *Vibrio* entre otros. El 81% (1081/1335) de estas entradas correspondieron a secuencias cerradas de plásmidos. Estos resultados indican que dicha estructura está altamente diseminada y sugieren que IS26 habría secuestrado los genes de RAM de la *vr-1* del *In37::ISCR1::qnrB10* permitiendo su diseminación entre diferentes grupos de plásmidos y especies bacterianas.

La estructura de 4.450 pb (*IS26/aac(6')-Ib-cr5/bla_{OXA-1}/ΔcatB3/IS26::IS26*) también se comparó con NCBI-BD (octubre 2022) y los resultados con mayor score correspondieron a una estructura con 100% de identidad pero con una longitud de sólo 3.630 pb que incluyó a *IS26/aac(6')-Ib-cr5/bla_{OXA-1}/ΔcatB3/ΔIS26*, donde Δ IS26 correspondió a la primera porción de IS26 antes de la inserción de la segunda copia de esta IS. También se buscó en NCBI-BD (octubre 2022) la IS similar a IS15, es decir una estructura de IS26 interrumpida por otra IS26, y se encontró un sólo resultado con 100% de cobertura y 100% de identidad de un plásmido de *Enterobacter roggenskampii* de origen animal no asociado a *aac(6')-Ib-cr*.

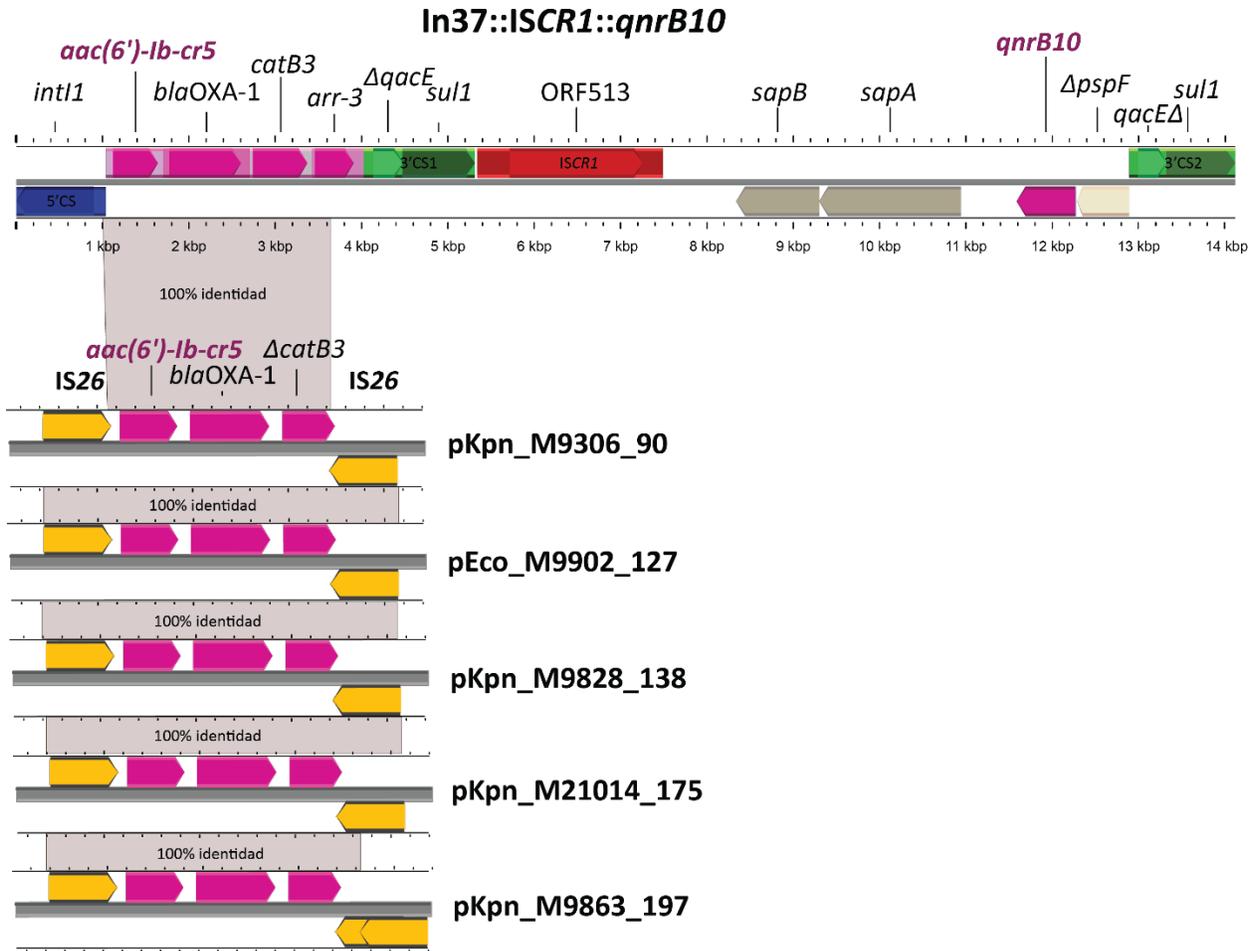


Figura 77. Comparación del *In37::ISCR1::qnrB10* con la estructura de los casetes *aac(6')-Ib-cr5*, *blaOXA-1* y $\Delta catB3$ flanqueada por IS26, encontrada en cinco plásmidos de la plasmoteca. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y la IS26 en amarillo. En barras grises se representan las regiones con una identidad mayor al 98%. La estructura que se identificó en estos plásmidos es 100% de identidad entre ellas, aunque la cobertura no es completa para pKpn_M9863_197 debido a que dentro de la IS26 que se encuentra río abajo de los casetes se insertó otra IS26. Además, los casetes, comparten un 100% de identidad con la vr-1 del *In37::ISCR1::qnrB1*.

Sección 5.07 Rearreglos genómicos complejos entre plásmidos

La plasmoteca contenía un porcentaje relevante de plásmidos híbridos (12%, 5/42), es decir que tenían más de una replicasa de distintos grupos. Además de esta particularidad, se observó que el tamaño de los plásmidos podía variar posteriormente al evento de conjugación, e incluso entre el estimado por endonucleasa S1 y el obtenido por secuenciación. Estos hechos complejizaron los resultados obtenidos de este trabajo, ya que para poder proponer modelos que expliquen estos rearrreglos, se realizaron secuenciaciones y análisis bioinformáticos

adicionales para descartar que estos hechos no fueran en realidad un artefacto de algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo.

(a) Plásmido fusión pEco_M9902_127

Se estimó mediante endonucleasa S1 que *E. coli* M9902 era portadora de dos plásmidos de 357 y 119 kb. El plásmido de menor tamaño se pudo transferir por conjugación y la secuenciación y ensamble arrojaron un contig circular cerrado de 127.921 pb. Esta secuencia correspondiente al plásmido pEco_M9902_127 contenía dos replicasas de diferentes grupos, N y FII. Además, se encontraron dos relaxasas, dos grupos de genes del sistema T4SS, y un sólo gen T4CP y en la comparación contra NCBI-BD se obtuvieron resultados con alta identidad correspondientes a plásmidos del grupo N o FII por separado. Todos estos resultados permitieron proponer la hipótesis de que este plásmido era una fusión de dos plásmidos pertenecientes a los grupos N y FII respectivamente. Además, la presencia de 7 copias de IS26 también favorecía la generación de rearrreglos genómicos complejos.

Para analizar la validez de esta hipótesis, se comparó pEco_M9902_127 con las secuencias de todos los otros plásmidos de la plasmoteca. Se encontró que el plásmido pKox_Q4020_53 (53.237 pb) del grupo N estaba 100% contenido en pEco_M9902_127 y además que la región adicional de pEco_M9902_127, es decir la que no correspondía a pKox_Q4020_53 estaba 100% contenida en otro plásmido: pKpn_M9306_90 (90.069 pb) perteneciente al grupo FII. Ambos plásmidos pKox_Q4020_53 y pKpn_M9306_90, contenían un segmento en común compuesto por los genes *tetR* y *tet(A)* (*tetR/tet(A)*) y las porciones de estos plásmidos en pEco_M9902_127 estaban flanqueadas por sendas copias de esta estructura. Esta situación sugirió que pEco_M9902_127 se habría originado a partir de una recombinación homóloga entre las regiones *tetR/tetA* de los plásmidos pKox_Q4020_53 y pKpn_M9306_90. Sin embargo, algunos fragmentos encontrados en pKpn_M9306_90 flanqueados por IS26, estaban en orientación invertida, o bien ausentes en pEco_M9902_127. Todas estas diferencias se pudieron explicar mediante rearrreglos generados por IS26. En efecto, la comparación entre pEco_M9902_127 y el plásmido que se habría obtenido directamente por fusión entre pKpn_M9306_90 y pKox_Q4020_53 que sería un ancestro del primero, mostró varias diferencias.

La primera diferencia radicó en el 5'CS del ICC1 que contenía *qnrB2* en el plásmido pEco_M9902_127. Esta región se encontró interrumpida por un segmento flanqueado por IS26 que se habría insertado allí a partir de una unidad translocable generada por una translocación de IS26 en cis ocurrida en una región correspondiente al otro plásmido parental pKpn_M9306_90 (Figura 78, señalado como "1"). La segunda diferencia también se relaciona con pKpn_M9306_90, ya que mediante la región del arreglo *tetR/tetA* se puede explicar que una recombinación homóloga, seguida de varios eventos mediados por IS26, habría producido la fusión que dio lugar al plásmido pEco_M9902_127 (Figura 78, señalado como "2"). La tercera y cuarta diferencia (señaladas en la Figura 78 como "3" y "4") son fragmentos que estaban

presentes en pKpn_M9306_90 y no se encontraron en pEco_M9902_127. La ausencia de los mismos se explica con los rearrreglos genómicos presentados en el modelo explicado en la Figura 79.

Además, en la búsqueda en NCBI-BD se encontró un plásmido denominado pC15-1a de 92.353 pb, que cubre en un 99,1% a pKpn_M9306_90 con 99,99% de identidad. Este plásmido está muy diseminado en Canadá y fue muy citado por ser el primer plásmido portador de *bla*_{CTX.M-15} secuenciado en su totalidad. Se estima que plásmidos similares a pC15-1a podrían estar relacionado con brotes ocurrido en India.¹⁰⁶ Además, otros plásmidos relacionados con pC15-1a que contienen otros segmentos de ADN con multiresistencias, que pueden ser explicados mediante rearrreglos genómicos mediados por IS26 y recombinación homóloga, fueron reportados en aislamientos clínicos de Australia.¹⁵⁶

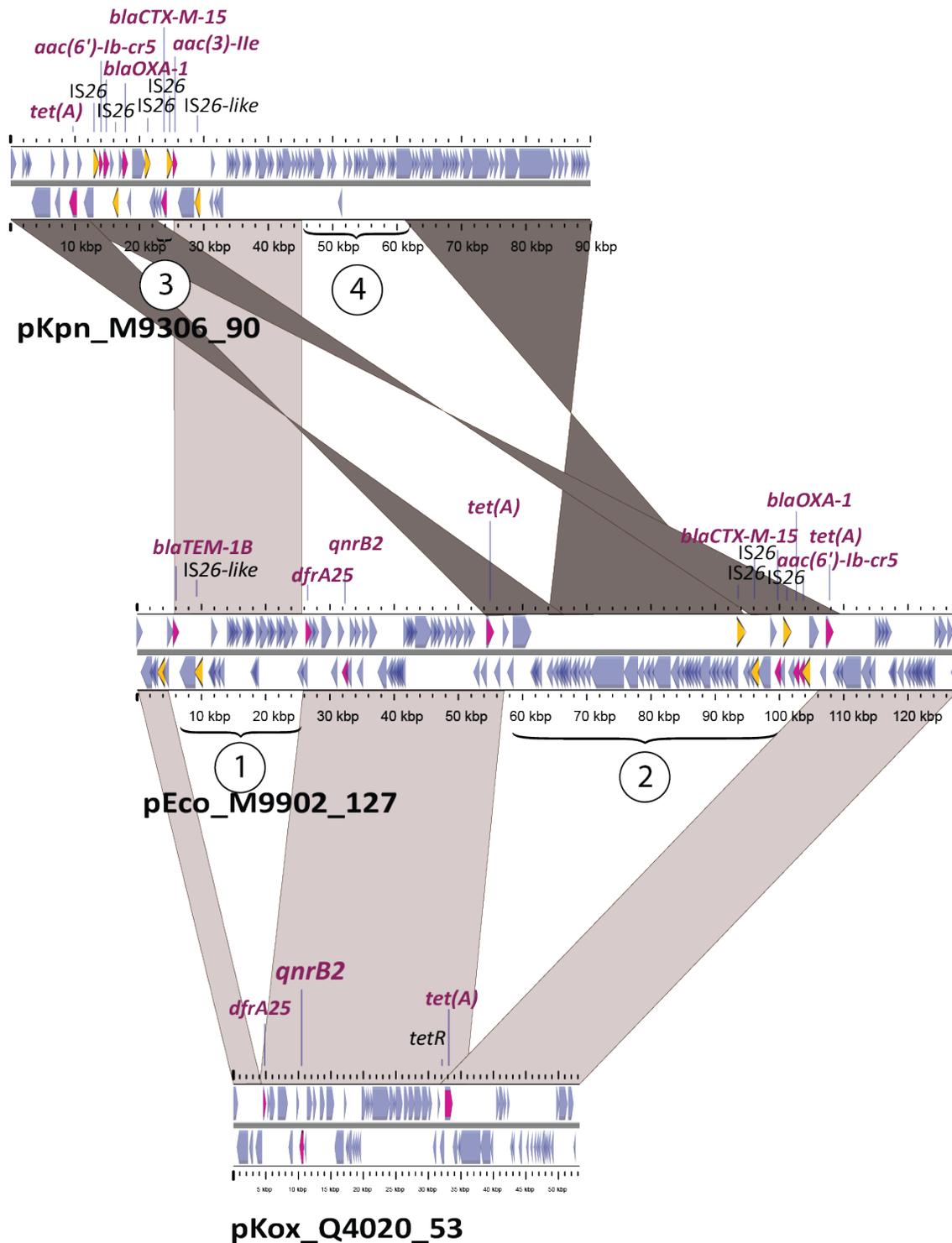


Figura 78. Alineamiento entre los plásmidos pKox_Q4020_53 y pKpn_M9306_90 que se encuentran relacionados con el plásmido híbrido pEco_M9902_127. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris claro aquellas con orientación directa y en gris oscuro con orientación complementaria.

Mediante el análisis de las secuencias flanqueantes externas a las copias de IS26 de todos los plásmidos se puede hacer un “rastreo” de los sitios en los que habrían ocurrido rearrreglos mediados por esta IS. Este método consiste en analizar las 8 pb que flanquean los sitios de inserción de la IS26 y buscar aquellos que son idénticos entre sí, teniendo en cuenta sus orientaciones. Este método ya fue descrito previamente por otros autores.¹⁵⁷ Mediante estas “huellas” genéticas y siguiendo los modelos de transposición descritos en la bibliografía para IS26, se pueden proponer rearrreglos genómicos mediados por esta IS que habrían ocurrido en las secuencias analizadas y confirmarlos mediante alineamientos. En la Figura 79 las secuencias flanqueantes se enumeran y se representan sus orientaciones mediante flechas violetas.

Utilizando este método, se propuso un modelo que presupone la existencia de un ancestro plasmídico con una copia menos de IS26 (Ancestro FII “A” en la Figura 79) que podría dar origen a pKpn_M9306_90, pC15-1a y al plásmido híbrido pEco_M9902_127 mediante rearrreglos genómicos. Para explicar el origen de pC15-1a (Figura 79 - b) se propuso que se habría dado una transposición en trans entre la cuarta copia del ancestro FII “A” y el sitio identificado en la imagen como 9. Para explicar el origen de pKpn_M9306_90 y pEco_M9902_127 habría ocurrido una transposición en trans entre la tercera copia de IS26 y el sitio 4 del ancestro FII “A”, dando lugar a la inversión de la región comprendida entre estos dos sitios (ancestro FII “B”). Este ancestro FII “B”, habría originado al pKpn_M9306_90 mediante una transposición en cis entre la segunda copia de IS26 y el sitio 3, produciendo una delección (Figura 79 - c). En cambio, el origen de pEco_M9902_127 se explica con múltiples rearrreglos: una recombinación homóloga entre la segunda y la tercera copia de IS26 del ancestro FII “B”, habría producido un ancestro FII “C” con una copia menos de IS26 y sin el sitio comprendido entre las copias mencionadas. Luego, una transposición en trans de la segunda copia de IS26 de este último ancestro (ancestro FII “C”) y el sitio 3 habrían dado lugar a una inversión de esta región, produciendo la molécula denominada ancestro FII “D”. Es importante recalcar que para que este modelo sea válido, esta última molécula (ancestro FII “D”) debe haber coexistido con el plásmido pKox_Q4020_53 en una misma célula, en donde habría ocurrido una recombinación homóloga entre los sitios *tetR/tet(A)* dando lugar a un ancestro híbrido con ambos plásmidos fusionados (ancestro FII “E”). Esta última molécula ancestro FII “E”, habría sufrido una transposición en cis entre la segunda copia IS26 y el sitio 0, dando lugar a una delección de la región (ancestro FII “F”). Esta unidad translocable que se habría escindido mediante el último evento de transposición de IS26 mencionado, no se habría perdido, sino que se habría insertado en la región 5’CS del ICC1 que forma parte de la región que originariamente pertenecía a pKox_Q4020_53 marcado en color amarillo en la Figura 79. Por último una transposición en cis de la cuarta copia de IS26 en pEco_M9902_53 delecionó una región correspondiente al plásmido F, localizada a la izquierda de dicha copia, dando lugar finalmente al plásmido híbrido pEco_M9902_127.

Cabe destacar que estos eventos no ocurrieron necesariamente en el orden temporal propuesto, pero se describieron de esta manera, ya que explican satisfactoriamente la obtención de la secuencia que representa el resultado final de los rearrreglos genómicos mencionados.

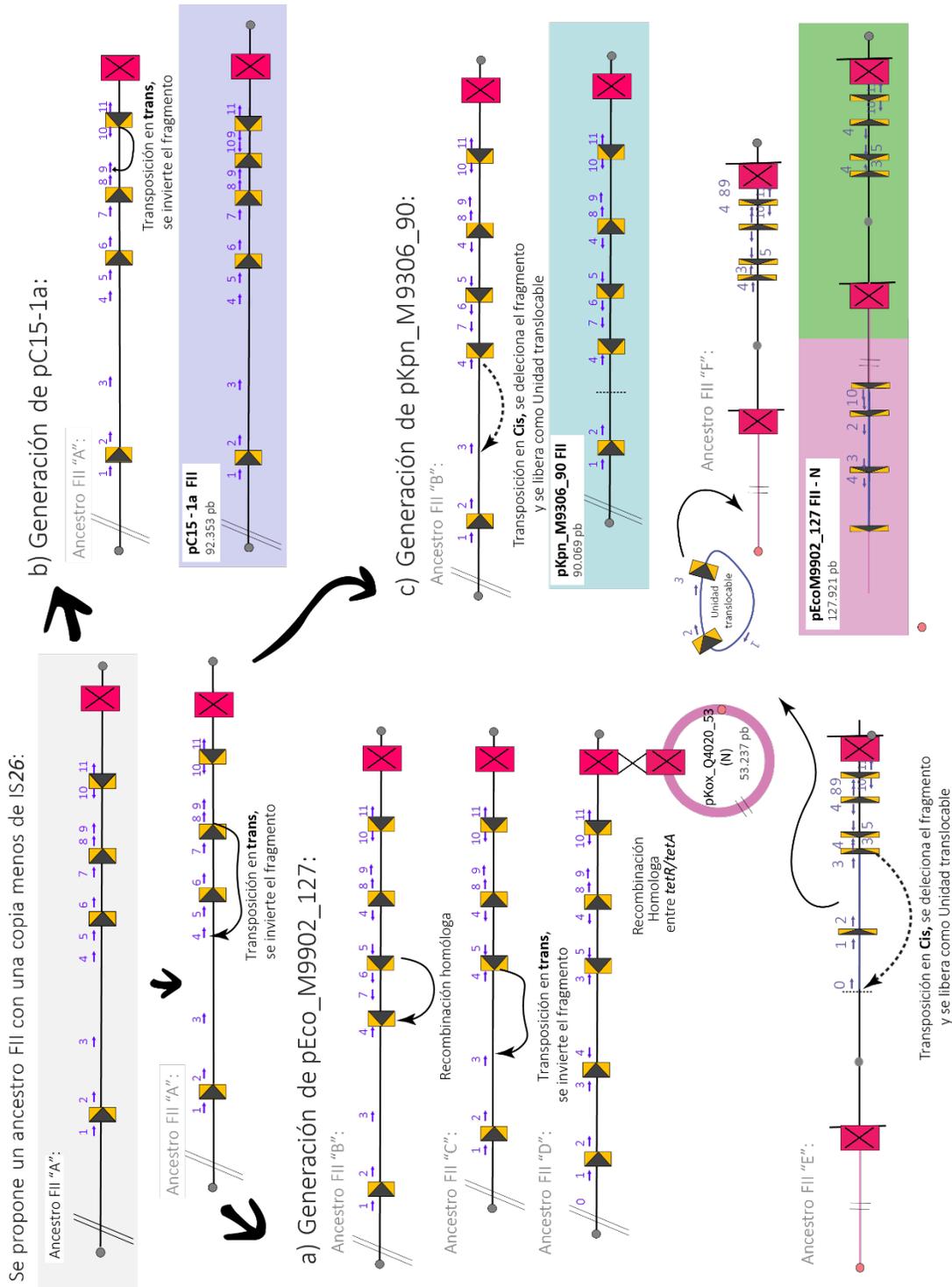


Figura 79. Modelo de rearrreglos genómicos que podrían dar lugar a pEco_M9902_127, pC15-1a y pKpn_M9306_90. Las líneas negras representan las secuencias de ADN de cada plásmido, representado de manera lineal para simplificar la comprensión. En forma de recuadro amarillo con una flecha negra se representaron las copias de IS26 con su orientación. El recuadro magenta con la cruz indica la región *tetR/tetA*, sitio donde ocurre la recombinación homóloga. Las flechas violetas indican las regiones flanqueantes del sitio de inserción de IS26. Las gráficas del modelo no se encuentran hechas a escala.

Para descartar que el plásmido pEco_M9902_127 sea producto de un artefacto de algunos de los procesos realizados hasta obtener el contig circular cerrado, se realizaron dos chequeos mediante diferentes técnicas. Se realizó un mapeo inverso de lecturas largas de ONT, utilizando el plásmido pEco_M9902_127 como referencia. Se confirmó que existe alta cobertura y continuidad en las lecturas que están en la zona de recombinación y en las uniones entre las secuencias de los plásmidos parentales pKox_Q4020_53 y pKpn_M9306_90. La otra verificación se realizó con un ensamble realizado con otra herramienta bioinformática. El Trycycler, es un ensamblador que utiliza lecturas largas con alta cobertura para realizar un ensamble de novo, con cuatro ensambladores diferentes. Las lecturas cortas sólo las utiliza para “el pulido” final de los contigs, es decir el correcto llamado de bases. Este ensamblador, arrojó exactamente el mismo resultado que el Unicycler que realiza un ensamble *de novo* de las lecturas cortas de Illumina, con un solo ensamblador. Con las lecturas largas realiza las uniones de los contigs que se generaron del ensamble de Illumina. Ambas herramientas, con flujos de trabajo muy diferentes arrojaron el mismo resultado para el plásmido pEco_M9902_127.

Por otro lado, se observó que había otros plásmidos similares a pKpn_M9306_90 en la plasmoteca. En particular, el plásmido pKpn_M9828_138 contenía pKpn_M9306_90 casi en su totalidad con 100% de identidad (Figura 80). Este plásmido además del replicón FII, tiene una replicasa del grupo R confirmando aún más el hecho de que los plásmidos F son propensos a rearrreglos genómicos con otros plásmidos. El plásmido pKpn_M9828_138 se comparó con el parental de la fusión pKpn_M9306_90 y se observó como principal diferencia un inserto de 54.976 pb (Figura 80 señalado como “1”), que sólo tienen identidad en 23,5 kb con los plásmidos pEcl_M21692_102 y pKqsq_M17277_123 de nuestra plasmoteca (datos no mostrados). Tampoco se encontró en la base de datos alguna secuencia que cubra este fragmento casi en su totalidad.

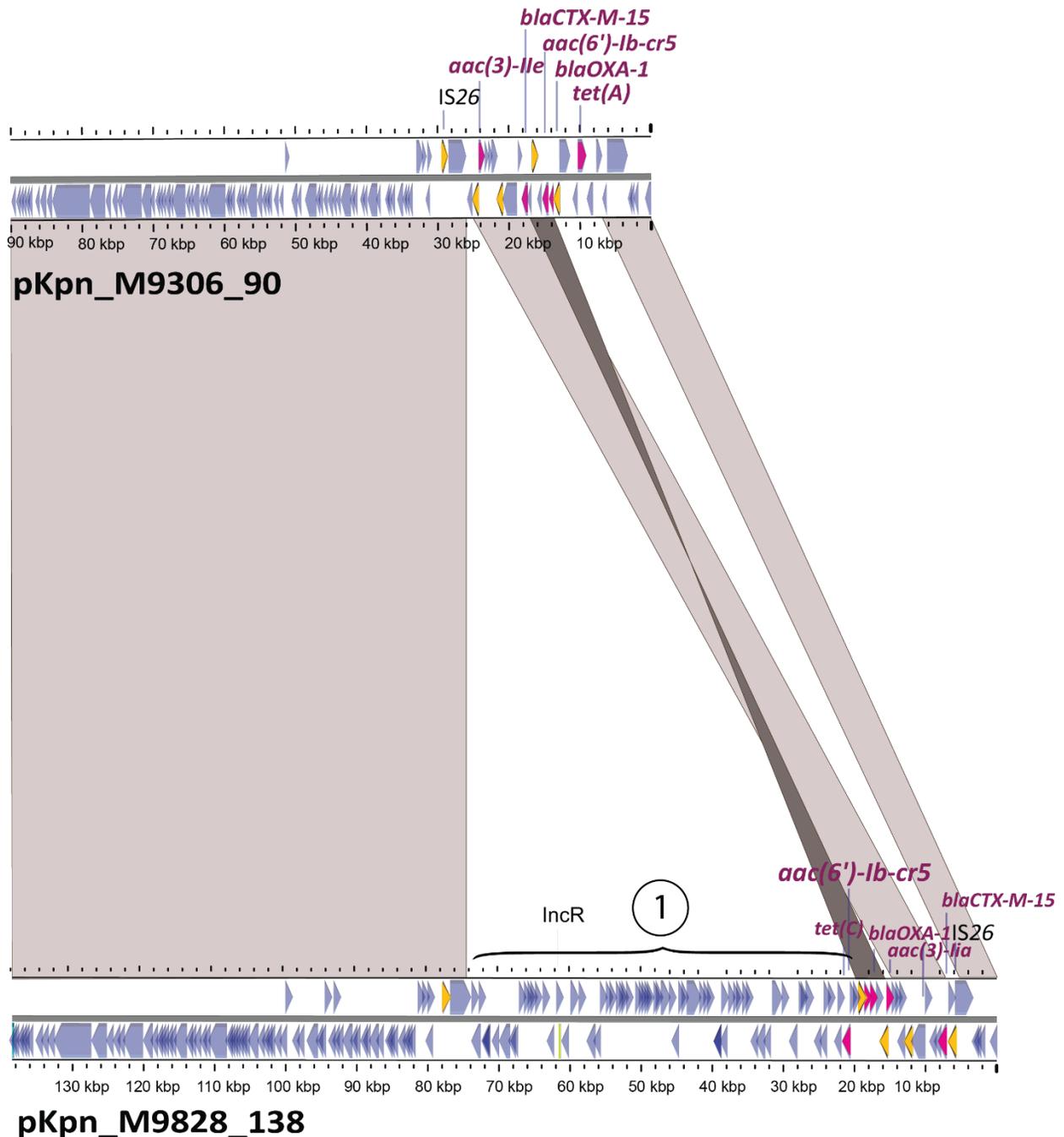


Figura 80. Alineamiento entre los plásmidos pKpn_M9306_90 y pKpn_M9828_138. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris claro aquellas con orientación directa y en gris oscuro con orientación complementaria.

En definitiva, la razón por la cual se habría seleccionado el plásmido fusión pEco_M9902_127 se puede explicar mediante la sumatoria de genes de RAM. Bajo esta hipótesis, el plásmido pKox_Q4020_53 aportó los genes *qnrB2* y *dfrA25* localizados en un ICC1 (sección 5.06

- d), mientras que pKpn_M9306_90 contribuyó con otros genes de RAM adicionales: *bla*_{CTXM-15}, *bla*_{OXA-1} y *aac(6')-Ib-cr5*. Por lo tanto, esta fusión se habría visto favorecida en un ambiente como el del hospital con múltiples y a veces cambiantes situaciones de presión antibiótica.

(b) Plásmido fusión pKpn_Q4016_381

El plásmido pKpn_Q4016_381 (381.943 pb), portador de *qnrB2*, contenía tres replicasas: C, FIB(K) y FII(K). Se observó que el plásmido de la plasmoteca pKpn_Q1211_174 (174.963 pb), que tenía las dos replicasas del grupo F, estaba totalmente contenido en pKpn_Q4016_381. La identidad entre estos plásmidos fue $\geq 99\%$ y pKpn_Q4016_381 tenía dos regiones adicionales que contenían ISs. Por otro lado, se encontró en la plasmoteca que el plásmido con mayor cobertura (82%) e identidad ($\geq 99,9\%$) a la región que no compartían entre pKpn_Q1211_174 y pKpn_Q4016_381, fue el plásmido pPst_M22246_146. Este plásmido perteneciente al grupo C, contenía genes de RAM incluido *qnrB1*, ausentes en el plásmido pKpn_Q4016_381. En la NCBI-BD no se encontró un plásmido con mayor cobertura e identidad que pPst_M22246_146 para la región mencionada.

La comparación de pKpn_Q1211_174, pPst_M22246_146 y pKpn_Q4016_381 mostró dos fragmentos indicados en la Figura 81 como "A", que contenía el operón *lac*, y "B" con dos IS flanqueando un IC1 y genes de RAM. Debido a que los fragmentos A y B están sólo presentes en pKpn_Q4016_381, y que están separando las regiones de unión de los plásmidos parentales, pKpn_Q1211_174 y pPst_M22246_146, es que no fue posible diseñar un modelo que permita explicar los eventos genéticos que habrían dado lugar a pKpn_Q4016_381.

Resultados Objetivo II - Rearreglos genómicos complejos entre plásmidos

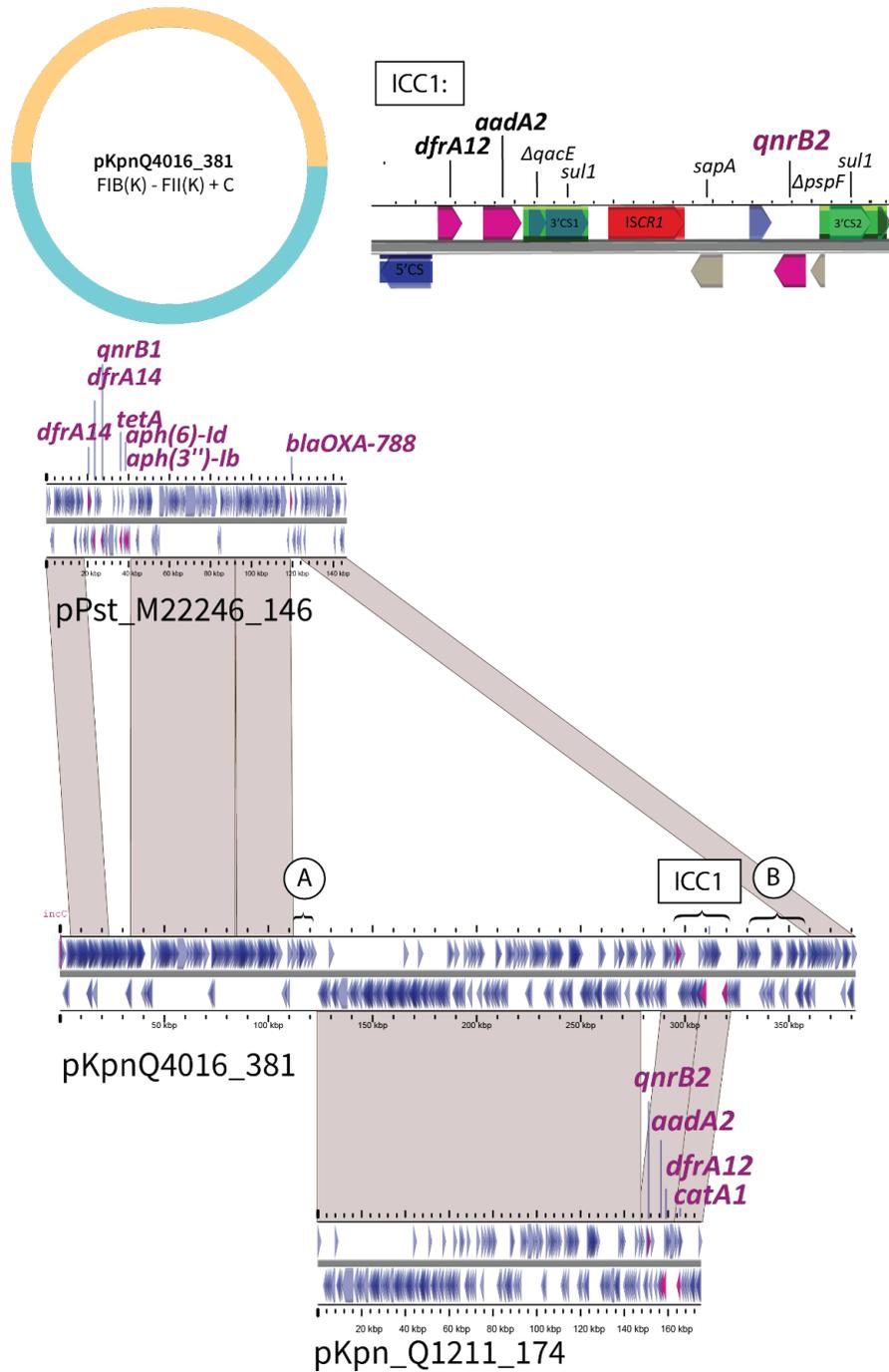


Figura 81. Alineamiento entre los plásmidos pKpn_Q1211_174, pPst_M22246_146 y pKpn_Q4016_381. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris claro aquellas con orientación directa y en gris oscuro con orientación complementaria. Arriba del alineamiento se muestra un esquema del ICC1 que comparten pKpn_Q1211_174 y pKpn_Q4016_381. La falta de continuidad de identidad señalada en "A" y "B" en pKpn_Q4016_381 son los sitios que no permitieron proponer un modelo que explique una fusión entre los replicones pKpn_Q1211_174 y pPst_M22246_146.

(c) Origen de los integrones twin con *qnrB10* y *bla*_{CTX-M-2}

Como ya se comentó en la sección 5.06 – f y 5.06 - j, en dos plásmidos de la plasmoteca pCfr_Q4143_61 (61.205pb) y pKpn_M9314_63 (63.400 pb), ambos del grupo N, se encontró una estructura twin, es decir con dos copias de *ISCR1*, la primera asociada a *qnrB10* y la segunda a *bla*_{CTX-M-2}. Por lo tanto, estos integrones twin se pueden pensar como una combinación de dos vr-2: una perteneciente a un ICC1 con *qnrB10*, y la segunda perteneciente a otro ICC1 con *bla*_{CTX-M-2}. Cabe destacar, que el 3'CS2 de los ICC1 con *qnrB10* es distinto del correspondiente a los ICC1 con *bla*_{CTX-M-2}. El primero tiene una delección de 67 pb en el extremo 5', mientras que el segundo tiene una delección de 70 pb. Esta diferencia se puede utilizar como “huella” para identificar el 3'CS2 que proviene de cada uno de estos ICC1.

Las vr-1 de los integrones twin de pCfr_Q4143_61 y pKpn_M9314_63 tuvieron el mismo arreglo de casetes que In37::*ISCR1*::*qnrB10*, es decir: *aac(6')-lb-cr5*, *bla*_{OXA-1}, *catB3*, y *arr-3*. A su vez, con esta misma vr-1, en la plasmoteca se identificaron dos plásmidos (pEae_M9518_55 y pKpn_Q3094_56) portadores de *bla*_{CTX-M-2} en la vr-2 de un ICC1. Cuando estos dos ICC1 se compararon con NCBI-BD (diciembre 2022), sólo se encontraron resultados con alta identidad con la vr-1 o la vr-2 por separado. Por esta razón, esta tesis constituye el primer reporte de un ICC1 con la vr-1 característica de In37::*ISCR1*::*qnrB10* pero con *bla*_{CTX-M-2} en la vr-2. Siguiendo la nomenclatura propuesta para los ICC1⁸², estos integrones se denominaron In37::*ISCR1*::*bla*_{CTX-M-2}.

Los dos plásmidos pEae_M9518_55 y pKpn_Q3094_56 portadores de In37::*ISCR1*::*bla*_{CTX-M-2}, también eran del grupo N y prácticamente idénticos entre ellos, salvo en la región 5' del *aac(6')-lb-cr* del plásmido pEae_M9518_55. Considerando que el pKpn_Q3094_56 tenía la región 5' del *aac(6')-lb-cr* igual a la de los integrones twin de pCfr_Q4143_61 y pKpn_M9314_63, se propuso un modelo en el cual pKpn_Q3094_56 sería uno de los plásmidos parentales que habría dado origen a los integrones twin (Figura 82). De acuerdo a este modelo, se habría producido una primera recombinación homóloga entre pKpn_Q3094_56 y cualquier otro plásmido con un ICC1 que portara *qnrB10* en su vr-2, y posiblemente de un grupo distinto al N. Esta primera recombinación homóloga se habría dado en algún punto de la región comprendida entre el 3'CS1 y el *ISCR1* de In37::*ISCR1*::*bla*_{CTX-M-2} y del ICC1 portador de *qnrB10*. Esto resultaría en un cointegrado con ambos integrones parentales en una misma molécula. Este cointegrado se habría resuelto mediante una segunda recombinación homóloga entre 3'CS2 del ICC1 portador de *qnrB10* con el 3'CS1 del In37::*ISCR1*::*bla*_{CTX-M-2}, dando como resultado el integrón twin compuesto por: 3'CS1/*ISCR1*/vr-2 con *qnrB10*/3'CS2 híbrido (con la delección de 67 pb característica de In37::*ISCR1*::*qnrB10*)/*ISCR1*/vr-2 con *bla*_{CTX-M-2}/3'CS3 del In37::*ISCR1*::*bla*_{CTX-M-2} (con su delección característica de 70 pb). Esta estructura es la que se observó en ambos integrones twin de los plásmidos pCfr_Q4143_61 y pKpn_M9314_63, soportando el modelo propuesto. Cabe destacar que estos integrones twin no se encontraron en la NCBI-BD (diciembre 2022).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que los ICC1 además de tener la capacidad de adquirir genes de RAM mediante la incorporación/escisión de casetes en la *vr-1*, podrían, mediante la recombinación de la *vr-2*, adquirir múltiples genes de RAM localizados en la misma. Esta plasticidad genómica tiene gran relevancia en la adquisición y diseminación de resistencia múltiple, en especial en ambientes con alta presión de selección.

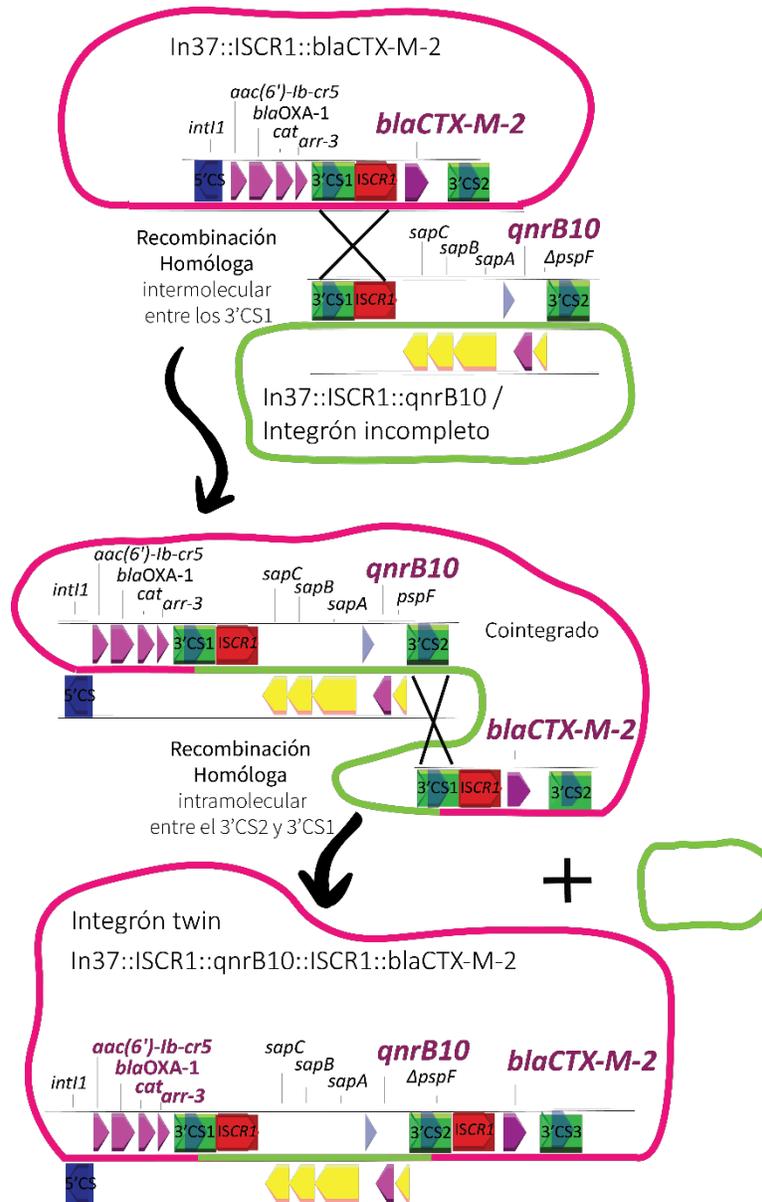


Figura 82. Modelo del origen de los integrones twin. Las líneas de colores representan dos plásmidos diferentes (verde y magenta) y no se encuentran a escala. Las cruces negras son los sitios donde ocurrieron recombinaciones homólogas. Por arriba y abajo de las líneas que representan a los plásmidos, se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. El resultado del modelo muestra un plásmido representado en magenta que adquirió un fragmento que proviene del plásmido representado en verde.

(d) Rearreglos genómicos complejos en el plásmido portador de genes PMQRs de *K. variicola* M7943

El aislamiento clínico *K. variicola* M7943 formó parte del primer reporte de PMQRs en Argentina y la primera descripción de *Inc37::ISCR1::qnrB10* en el mundo.⁸² Este ICC1 que contenía los genes PMQRs *qnrB10* y *aac(6′)-Ib-cr5*, se transfirió por conjugación a *E. coli* J53 Az-R y su transconjugante se denominó TC-M9216. En este trabajo de tesis el análisis por endonucleasa S1 del aislamiento clínico parental M7943 mostró dos bandas de tamaños estimados de 83 y 372 kb, mientras que para su transconjugante se obtuvo una sola banda de 62 kb. Como los perfiles plasmídicos de M7943 y TC-M9216 no coincidían, se repitió el ensayo de conjugación otras dos veces. En ambos casos se obtuvieron idénticos resultados, transconjugantes con el mismo perfil de sensibilidad a antibióticos que tenían una sola banda por endonucleasa S1 con un tamaño estimado de 369 kb, en concordancia con la banda de 372 kb de M7943, por lo que se decidió incluir al plásmido de una de esas transconjugantes (TC-M23825) en la plasmoteca. Cabe destacar que se hicieron reiterados ensayos de endonucleasa S1, y en todos se obtuvieron los mismos resultados, es decir una banda de 369 kb. El ensamble híbrido de las secuencias de TC-M23825 resultó en un solo plásmido de 60.263 pb perteneciente al grupo N, que fue el único de la plasmoteca que mostró una gran discrepancia entre el resultado de endonucleasa S1 y NGS (Figura 44). Este plásmido se denominó pKva_M7943_60 y se utilizó para todos los análisis subsiguientes. Al final de la etapa experimental de esta tesis surgió la posibilidad de analizar mediante NGS el aislamiento clínico dador M7943, y la transconjugante TC-M9216, para poder evaluar cuáles fueron los rearrreglos genómicos que dieron lugar a dicha discrepancia.

El ensamble híbrido de las secuencias de TC-M9216 resultó en un plásmido de 65.896 pb, que se denominó pM9216_A_A2_65 y también perteneció al grupo N. Este tamaño coincidió con lo que se estimó por endonucleasa S1 (Tabla 13). Para el aislamiento clínico M7943 se obtuvieron plásmidos de 87.911 y 384.128 pb que también coincidieron con los resultados de endonucleasa S1. El plásmido de mayor tamaño (384.128 pb) contenía los genes PMQRs, por lo cual se designó como pKva_M7943_384 y pertenecía a los grupos HI y N (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados obtenidos por endonucleasa S1 y NGS para el aislamiento clínico M7943 y sus transconjugantes TC-M9216 y TC-M23825.

Cepa	S1 (kb)	NGS (pb)	Nombre plásmido	Grupo
M7943 (Dadora)	372	384.128	pKva_M7943_384	HI, HI2A, N
	83	87.911		IncFIB(K)
TC-M9216 (Transconjugante)	62	65.896	pM9216_A_A2_65	N
TC-M23825 (Transconjugante)	369	60.263	pKva_M7943_60	N

En naranja se resaltan los valores conflictivos.

Un análisis de comparación de secuencias mostró que pKva_M7943_384 contenía en un 100% a pM9216_A_A2_65 y a pKva_M7943_60 (Figura 83). El resto de la secuencia de pKva_M7943_384 tuvo entre 91-93% de cobertura y 99,99%-100% de identidad con los cuatro plásmidos del grupo HI con *qnrB10* de la plasmoteca: pEko_M9921_354, pEcl_Q5029_328, pSma_M9684_342 y pEcl_M7916_325 (Tabla 11).

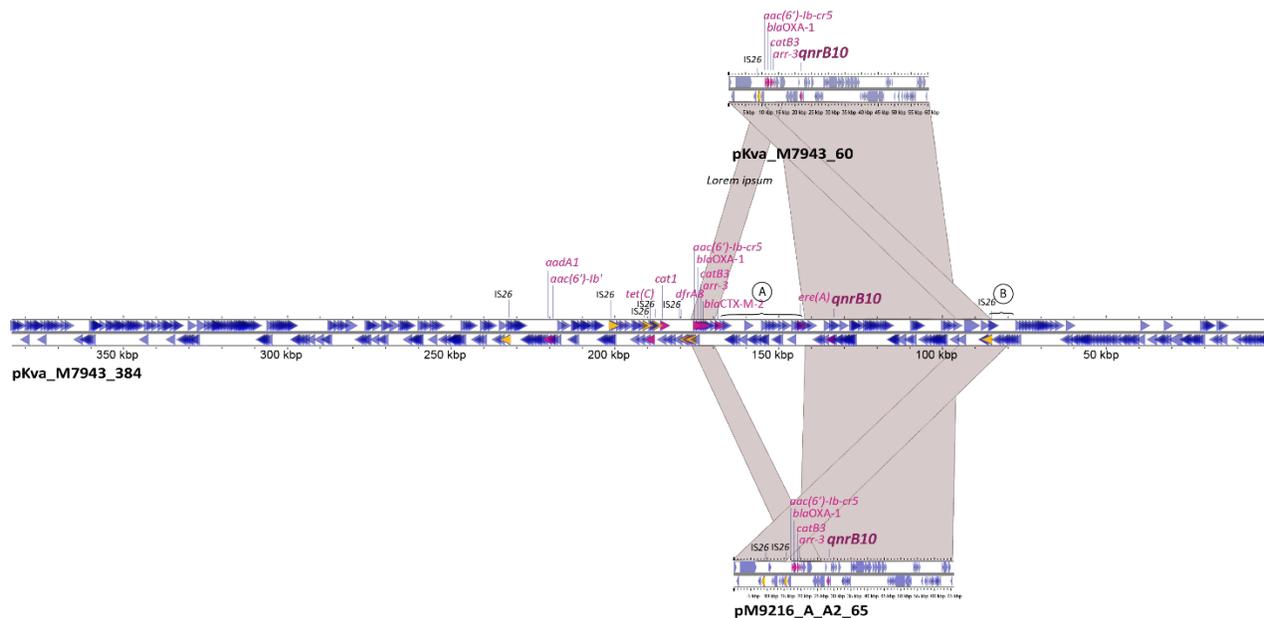


Figura 83. Alineamiento entre pKva_M7943_60, pM9216_A_A2_65 y pKva_M7943_384. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% en gris con orientación directa. Las regiones marcadas en la figura como “A” y “B” se analizan en los modelos propuestos más adelante.

Se compararon los plásmidos de las transconjugantes pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65, ya que ambos tenían los mismos genes PMQRs (*qnrB10* y *aac(6′)-Ib-cr5*), tamaños similares y sólo se observaron dos diferencias que se muestran en la Figura 84. Primero, un fragmento de 600 pb marcado como “2”, presente en pKva_M7943_60 y ausente en pM9216_A_A2_65. La otra diferencia, indicada como “1” en la Figura 84, fue que en lugar de una IS26 presente en pKva_M7943_60 se observó un fragmento con varios ORFs delimitado por dos copias de IS26 en igual orientación en pM9216_A_A2_65.

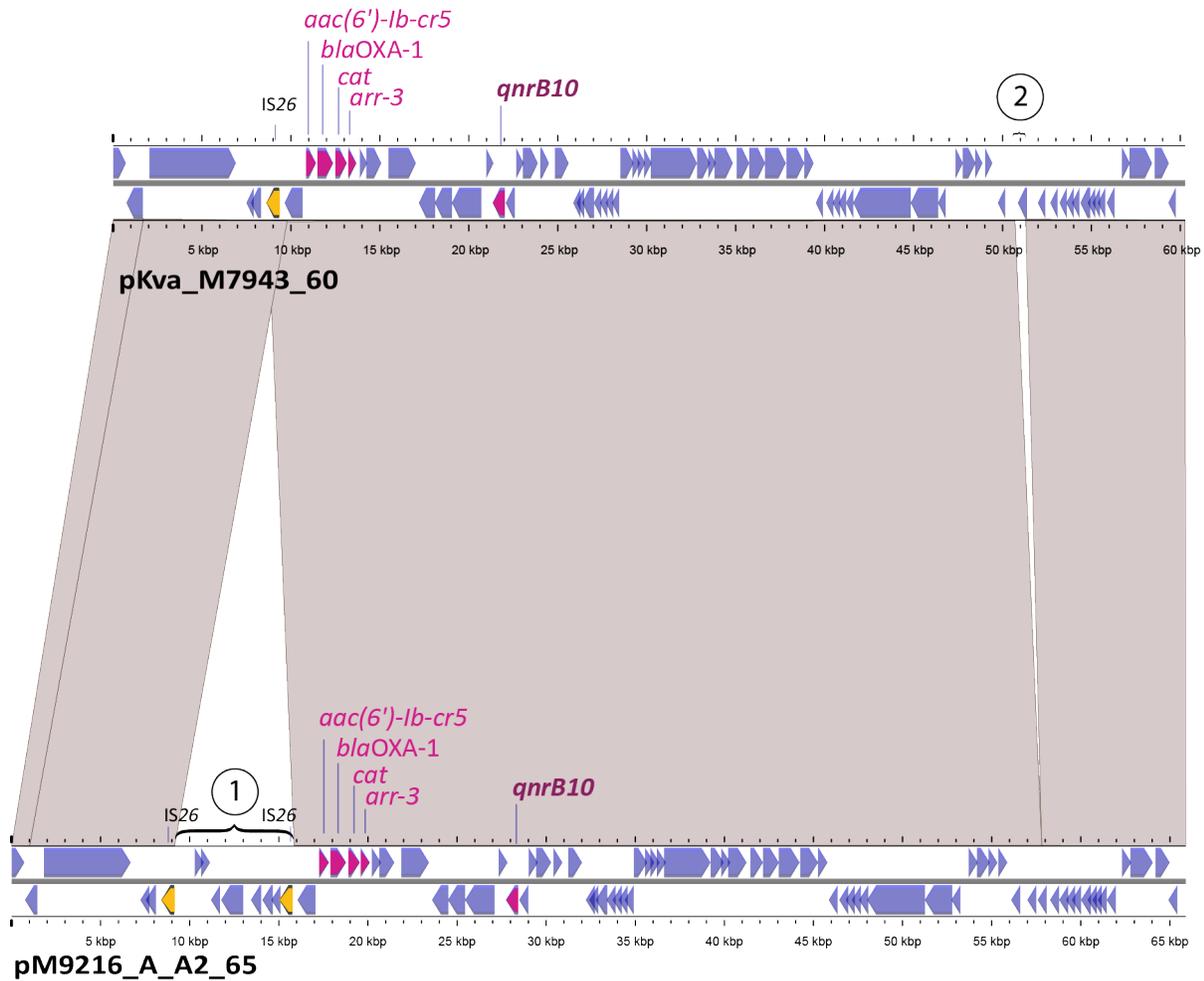


Figura 84. Alineamiento entre los plásmidos pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta y la IS26 se resalta en amarillo con borde negro. La regla indica la numeración otorgada para cada plásmido en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En barras grises se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98%. Las regiones marcadas en la figura como “1” y “2” son las diferencias encontradas entre los plásmidos.

Este segundo rearreglo se podría explicar mediante dos maneras. La primera, consiste en que se haya dado una recombinación homóloga intramolecular entre las dos IS26, y de esta manera se escindió el fragmento de 5.801 pb (Figura 85).

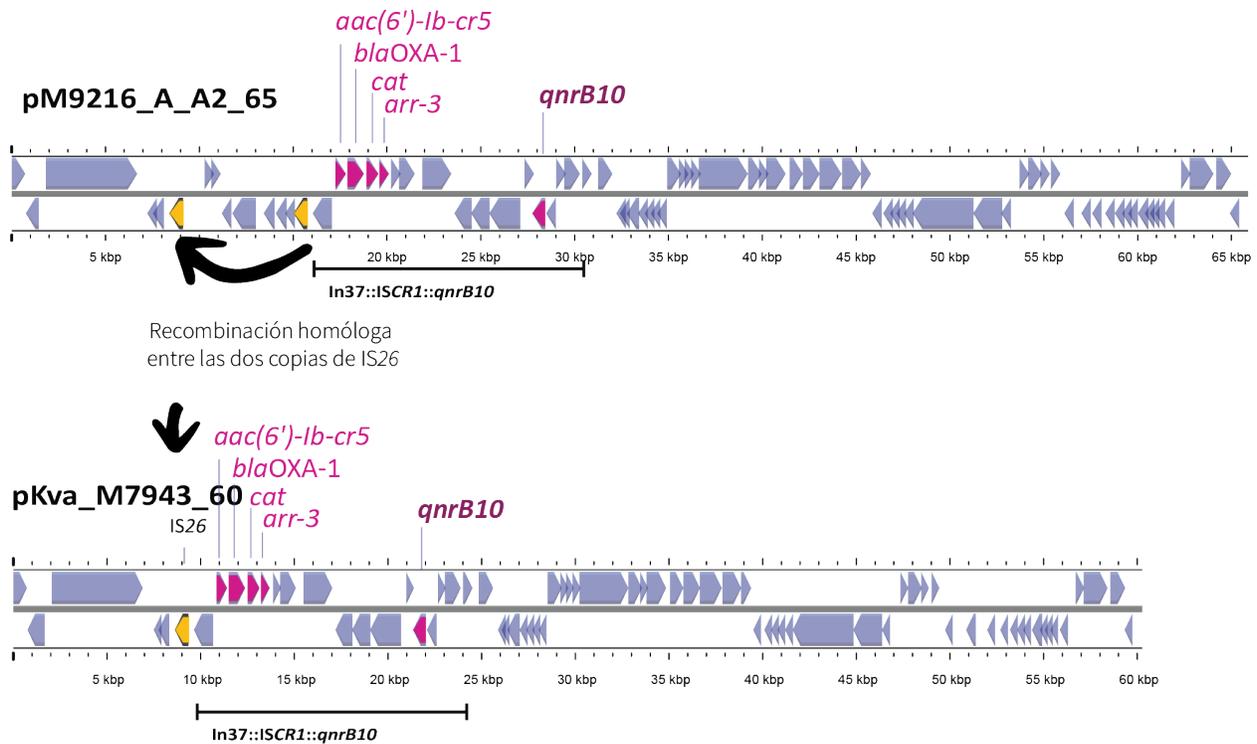


Figura 85. Modelo de recombinación homóloga entre las dos copias de IS26 que daría lugar a la diferencia entre pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM muestran en color magenta y la IS26 s amarillo con borde negro.

La otra explicación más parsimoniosa se fundamenta en que el origen de ambos plásmidos, pKva_M7943_60 y pM9216_A_A2_65, fue a partir de rearrreglos genómicos en el plásmido pKva_M7943_384. Considerando que ambos plásmidos N están completamente contenidos y con 100% de identidad en pKva_M7943_384, se proponen los siguientes modelos.

En el modelo para explicar la generación de pKva_M7943_60 (Figura 86), se propuso que pKva_M7943_384 habría sufrido dos eventos de recombinación homóloga intramoleculares: 1) entre la sexta y séptima copia de IS26, antes del fragmento marcado como "B" en la Figura 86, dando lugar a la pérdida de gran parte del plásmido que corresponde a la región perteneciente al grupo HI; 2) entre regiones 3'CS1 del ICC1 incompleto portador de *qnrB10* y del In37::ISCR1::bla_{CTX-M-2}. Este evento daría lugar la pérdida del fragmento marcado como "A" en la Figura 86.

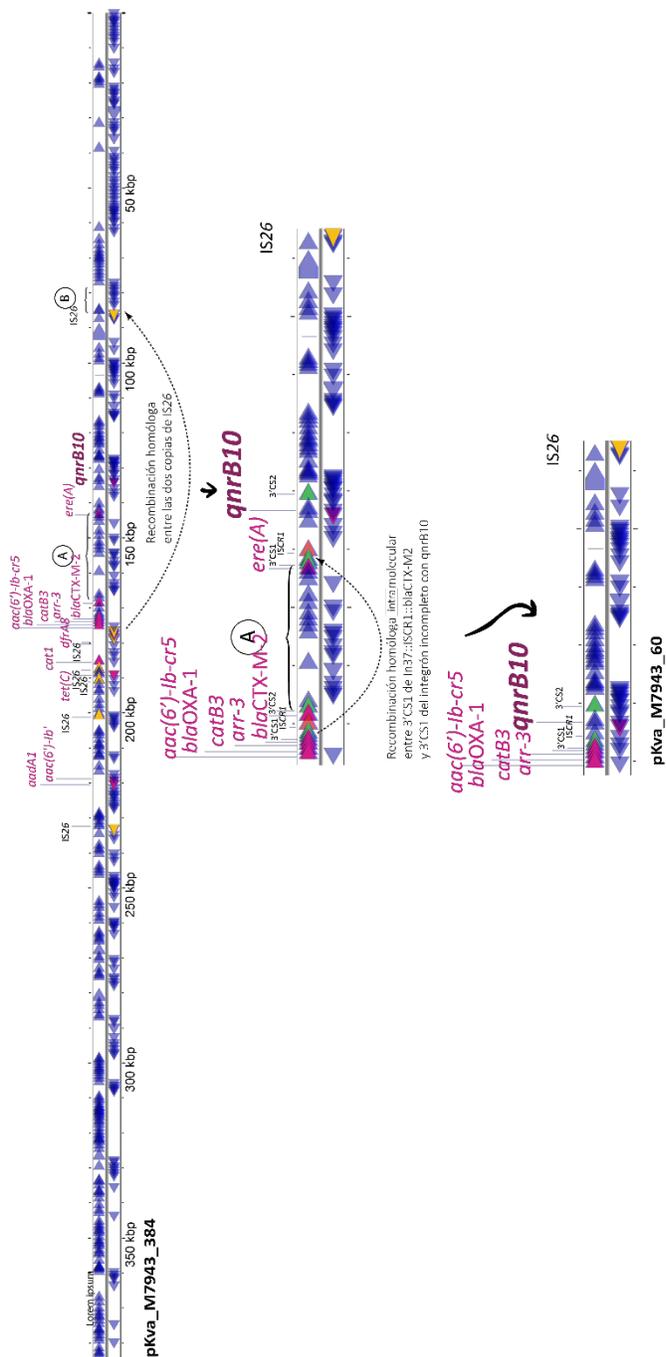


Figura 86. Modelo que explica los rearrreglos genómicos que darían lugar a pKva_M7943_60. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada a pKva_M7943_384 en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En color magenta se muestran los genes de RAM y la IS26 amarillo con borde negro. Mediante dos eventos de recombinación homóloga intramoleculares en pKva_M7943_384 se explicaría la generación de pKva_M7943_60. Una de las recombinaciones habría ocurrido entre la sexta y séptima copia de IS26, marcados con la flecha punteada, antes del fragmento marcado como “B”, dando lugar a la pérdida de gran parte del plásmido que corresponde a la región perteneciente al grupo HI. El segundo evento sería entre las regiones 3’CS1 de un ICC1 incompleto portador de *qnrB10* (idéntico a los descriptos en Figura 63) y el 3’CS1 del In37::ISCR1::*blaCTX-M-2*.

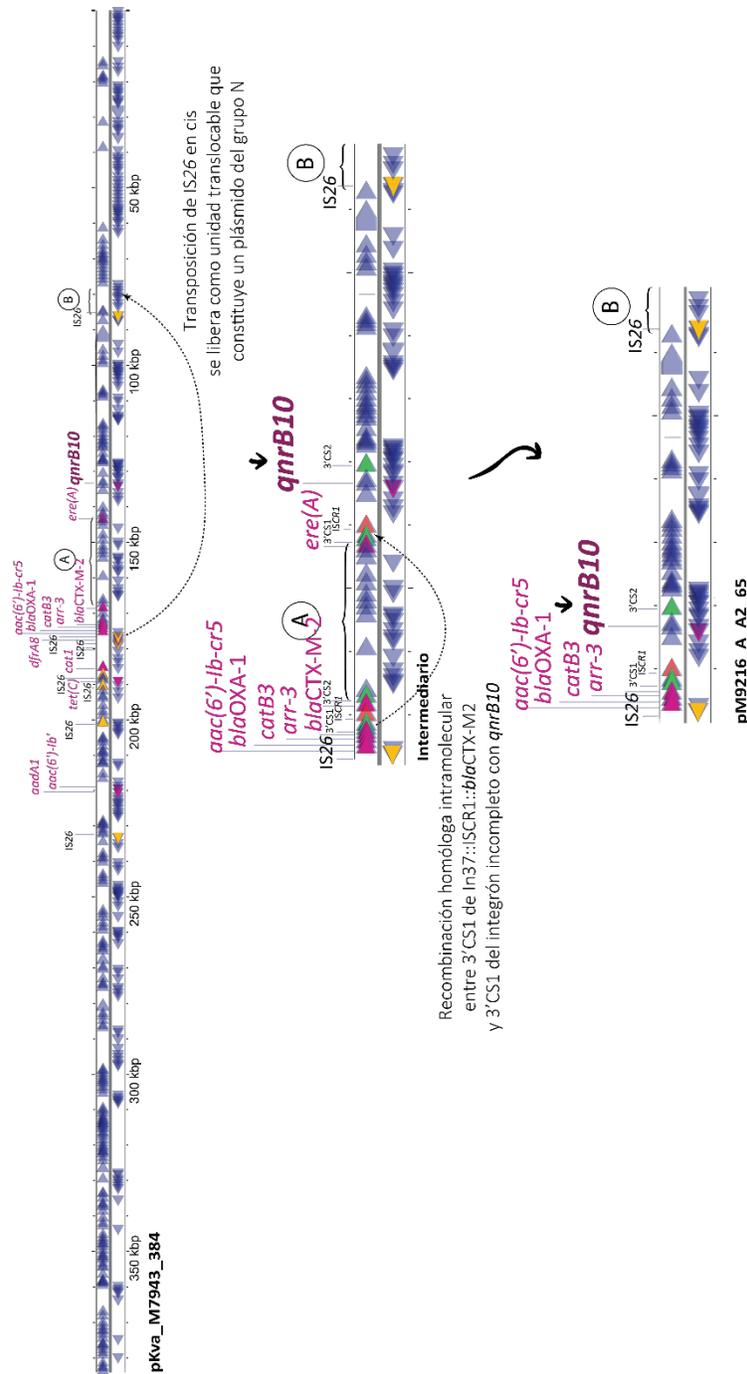


Figura 87. Modelo que explica los dos rearrreglos genómicos que darían lugar a pM9216_A_A2_65. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada a pKva_M7943_384 en la cual la base 1 corresponde a la primera base del gen *rep*. En color magenta se muestran los genes de RAM y la IS26 amarillo con borde negro. Uno de los rearrreglos se habría producido mediante un evento de transposición en cis de la sexta copia de IS26 el extremo del fragmento marcado como “B”, dando lugar a la escisión de la región comprendida entre los extremos de la flecha de la línea punteada. El otro evento consistiría en una recombinación homóloga entre las regiones 3'CS1 de un ICC1 incompleto portador de *qnrB10* (idéntico a los descritos en la Figura 63 y del In37::ISCR1::blaCTX-M-2 dando lugar a la pérdida del fragmento “A”.

Por otra parte, el modelo para explicar la generación de pM9216_A_A2_65 (Figura 87), involucra dos eventos en pKva_M7943_384: 1) transposición de IS26 en cis hacia el sitio que está marcado en la Figura 87 al final del fragmento "B", dando lugar a la escisión como plásmido N de la región comprendida entre dicha IS26 y el final del fragmento "B"; de este fragmento como unidad translocable; 2) una recombinación homóloga intramolecular entre regiones 3'CS1 del ICC1 incompleto portador de *qnrB10* y el 3'CS1 del In37::ISCR1::*bla*_{CTX-M-2}. Este evento daría lugar a la pérdida del fragmento marcado como "A" en la Figura 87.

Es posible que los rearrreglos genómicos, incluida la pérdida de gran parte del plásmido pKva_M7943_384, hayan ocurrido debido a la pérdida de presión de selección. El plásmido más grande, identificado en el aislamiento clínico podría tener una fisiología en balance que le permite sostener su gran tamaño. Sin embargo, durante la conjugación en el laboratorio, el uso de ciprofloxacina podría generar una presión de selección favoreciendo el plásmido N de menor tamaño que contiene el gen *qnrB10* y la consecuente pérdida del fragmento conteniendo la región del grupo HI. Esto pudo deberse al alto costo fisiológico que tiene para *E. coli* J53 en las condiciones dadas por el ensayo de laboratorio. Es por esta razón que los resultados del ensayo de endonucleasa S1 para pKva_M7943_384 y pM9216_A_A2_65 coinciden con los obtenidos por secuenciación. Sin embargo, en el caso de pKva_M7943_60 en el ensayo de conjugación se seleccionó el plásmido de 384 kb (según endonucleasa S1), pero durante el cultivo realizado para la secuenciación y al no utilizar presión de selección, se favoreció la pérdida de la secuencia correspondiente al grupo HI. Además, la falta de presencia de ampicilina en los ensayos de laboratorio también pudo haber favorecido la pérdida de *bla*_{CTX-M-2}.

Conclusiones

"La ciencia no tiene patria, porque el conocimiento es patrimonio de la humanidad."

- Louis Pasteur

6 Conclusiones

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública que ejerce una enorme presión sobre los sistemas de salud. Una consecuencia preocupante del incremento de la resistencia a los antimicrobianos es la emergencia y diseminación de gérmenes panresistentes. La diseminación horizontal de mecanismos de resistencia juega un papel fundamental en esta problemática y la comprensión de su funcionamiento es clave para establecer estrategias que permitan su contención. En esta tesis se estudiaron mecanismos plasmídicos de resistencia a quinolonas en enterobacterias de origen clínico y los elementos genéticos móviles asociados. Se construyó una plasmoteca con la secuencia completa de 42 plásmidos portadores de PMQRs y se analizaron a nivel molecular mediante herramientas bioinformáticas.

El análisis completo de las secuencias de la plasmoteca permitió identificar un gran número y diversidad de plataformas genéticas responsables de la diseminación de los PMQR circulantes en Argentina, y algunas de estas fueron reportadas por primera vez en esta tesis. Uno de los principales hallazgos de este trabajo fue la identificación de múltiples rearrreglos genómicos como recombinación homóloga, inserciones, deleciones, fusiones, escisiones entre otros eventos genéticos. Estos resultados reflejan la elevada plasticidad que caracteriza a estos plásmidos portadores de PMQRs. Además, este estudio permitió determinar que las secuencias de inserción, y en particular la IS26, parecen tener un papel clave en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos. En base a los resultados obtenidos, se plantearon distintos modelos que podrían explicar los posibles procesos biológicos ocurridos que dieron lugar a plásmidos portadores de múltiples resistencias incluidos los genes PMQRs. Los resultados detallados en esta tesis reflejan la complejidad de la evolución plasmídica que permite a las bacterias adaptarse a ambientes con alta presión de selección, como ocurre en el ámbito hospitalario.

La comprensión de los mecanismos involucrados en la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos, y el papel que juegan los elementos genéticos móviles permitirá explorar estrategias innovadoras para combatir esta problemática. La información generada en esta tesis doctoral forma parte del patrimonio genómico nacional y posee un valor agregado con impacto significativo en el conocimiento científico y tecnológico.

7 Referencias bibliográficas

- ¹ Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2021). The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: "Enterobacterales"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. *Clinical microbiology reviews*, 34(2), e00174-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>
- ² Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes [Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens Consenso latino-americano para definição, categorização e notificação de patógenos multirresistentes, com resistência ampliada ou panresistentes]. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 43, e65. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- ³ Ali, J., Rafiq, Q. A., & Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, 4(4), FSO290. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0109>
- ⁴ Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of global antimicrobial resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- ⁵ World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>.
- ⁶ Price R. (2016). O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. *European journal of hospital pharmacy: science and practice*, 23(4), 245–247. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2016-001013>
- ⁷ Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- ⁸ Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570>.
- ⁹ Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*, 362(19), 1804–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0904124>
- ¹⁰ Carvalho MJ, Tyrrell J, Jones LS, Walsh TR. On the road again – the antibiotic resistance superhighway. En: *The battle against microbial pathogens: Basic science, technological advances and educational programs* (2nd edition), páginas: 955-964. Editorial Formatex (Méndez-Vilas A, editor), España 2015. ISBN-13 Vol. 2: 978-84-942134-7-2
- ¹¹ Balcázar J. L. (2020). Implications of bacteriophages on the acquisition and spread of antibiotic resistance in the environment. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 23(4), 475–479. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00121-5>

- ¹² Dell'Annunziata, F., Folliero, V., Giugliano, R., De Filippis, A., Santarcangelo, C., Izzo, V., Daglia, M., Galdiero, M., Arciola, C. R., & Franci, G. (2021). Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5985. <https://doi.org/10.3390/ijms22115985>
- ¹³ Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 6, 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- ¹⁴ Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- ¹⁵ Guglielmini, J., Néron, B., Abby, S. S., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic acids research*, 42(9), 5715–5727. <https://doi.org/10.1093/nar/gku194>
- ¹⁶ Dimitriu T. (2022). Evolution of horizontal transmission in antimicrobial resistance plasmids. *Microbiology (Reading, England)*, 168(7), 10.1099/mic.0.001214. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001214>
- ¹⁷ Baker, K. S., Dallman, T. J., Field, N., Childs, T., Mitchell, H., Day, M., Weill, F. X., Lefèvre, S., Tourdjman, M., Hughes, G., Jenkins, C., & Thomson, N. (2018). Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple Shigella species. *Nature communications*, 9(1), 1462. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>
- ¹⁸ Matamoros, S., van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemse, N., Melles, D. C., Penders, J., Vinh, T. N., Thi Hoa, N., Bootsma, M., van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Oude Lashof, A., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., de Jong, M. D., & Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific reports*, 7(1), 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>
- ¹⁹ Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., & de la Cruz Fd, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular microbiology*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014>
- ²⁰ Ramsay, J. P., & Firth, N. (2017). Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements. *Current opinion in microbiology*, 38, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.003>
- ²¹ Carattoli A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(6-7), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- ²² Lili, L. N., Britton, N. F., & Feil, E. J. (2007). The persistence of parasitic plasmids. *Genetics*, 177(1), 399–405. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.077420>
- ²³ Kollek, R., Oertel, W., & Goebel, W. (1978). Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1. *Molecular & general genetics : MGG*, 162(1), 51–57. <https://doi.org/10.1007/BF00333850>
- ²⁴ Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- ²⁵ Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

- ²⁶ Schmartz, G. P., Hartung, A., Hirsch, P., Kern, F., Fehlmann, T., Müller, R., & Keller, A. (2022). PLSDB: advancing a comprehensive database of bacterial plasmids. *Nucleic acids research*, *50*(D1), D273–D278. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1111>
- ²⁷ Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid*, *80*, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.04.003>
- ²⁸ Koraimann G. (2018). Spread and Persistence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes: A Ride on the F Plasmid Conjugation Module. *EcoSal Plus*, *8*(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2018>
- ²⁹ Liang, Q., Yin, Z., Zhao, Y., Liang, L., Feng, J., Zhan, Z., Wang, H., Song, Y., Tong, Y., Wu, W., Chen, W., Wang, J., Jiang, L., & Zhou, D. (2017). Sequencing and comparative genomics analysis of the IncH2 plasmids pT5282-mpHA and p112298-catA and the IncH5 plasmid pYNKP001-dfrA. *International journal of antimicrobial agents*, *49*(6), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.021>
- ³⁰ Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., & Carattoli, A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the bla_{NDM-1}, bla_{CTX-M-15} and qnrB1 genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *67*(7), 1645–1650. <https://doi.org/10.1093/jac/dks114>
- ³¹ Taylor D. E. (2009). Thermosensitive nature of IncH1 plasmid transfer. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(6), 2703. <https://doi.org/10.1128/AAC.00230-09>
- ³² Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V., & Endimiani, A. (2015). Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS one*, *10*(5), e0123063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123063>
- ³³ Richards, H., & Datta, N. (1979). Reclassification of incompatibility group L (IncL) plasmids. *Plasmid*, *2*(2), 293–295. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(79\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0147-619x(79)90048-9)
- ³⁴ García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L., & Carattoli, A. (2011). Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *66*(9), 1987–1991. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr225>
- ³⁵ Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., & Chandler, M. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiology spectrum*, *3*(2), MDNA3–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014>
- ³⁶ Albornoz, E., Tijet, N., De Belder, D., Gomez, S., Martino, F., Corso, A., Melano, R. G., & Petroni, A. (2017). qnrE1, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance Genes, Originated from the Chromosome of Enterobacter Species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(5), e02555-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02555-16>
- ³⁷ Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2021). Targeted Conservative Cointegrate Formation Mediated by IS26 Family Members Requires Sequence Identity at the Reacting End. *mSphere*, *6*(1), e01321-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01321-20>
- ³⁸ Hall R. M. (2022). Comment on "the IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26" by Varani and co-authors. *Mobile DNA*, *13*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00257-9>
- ³⁹ Varani, A., He, S., Siguier, P., Ross, K., & Chandler, M. (2021). The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. *Mobile DNA*, *12*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00239-x>

- ⁴⁰ Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2016). IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes. *mSphere*, 1(2), e00038-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00038-16>
- ⁴¹ Heffron, F., McCarthy, B. J., Ohtsubo, H., & Ohtsubo, E. (1979). DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell*, 18(4), 1153–1163. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90228-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90228-9)
- ⁴² Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., & Hallet, B. (2015). The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014>
- ⁴³ Tolmasky, M. E., & Crosa, J. H. (1987). Tn1331, a novel multiresistance transposon encoding resistance to amikacin and ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(12), 1955–1960. <https://doi.org/10.1128/AAC.31.12.1955>
- ⁴⁴ Fonseca, É. L., & Vicente, A. C. (2022). Integron Functionality and Genome Innovation: An Update on the Subtle and Smart Strategy of Integrase and Gene Cassette Expression Regulation. *Microorganisms*, 10(2), 224. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020224>
- ⁴⁵ Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(4), 272–288. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x>
- ⁴⁶ Ghaly, T. M., Gillings, M. R., Penesyan, A., Qi, Q., Rajabal, V., & Tetu, S. G. (2021). The Natural History of Integrons. *Microorganisms*, 9(11), 2212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112212>
- ⁴⁷ Toleman, M. A., Bennett, P. M., & Walsh, T. R. (2006). Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 58(1), 1–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl204>
- ⁴⁸ Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, 15(6), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- ⁴⁹ Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- ⁵⁰ Rocha, E. P., Cornet, E., & Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS genetics*, 1(2), e15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010015>
- ⁵¹ Tatum, E. L., & Lederberg, J. (1947). Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 53(6), 673–684. <https://doi.org/10.1128/jb.53.6.673-684.1947>
- ⁵² Weaver R. F. (2012). *Molecular biology* (5th ed.). McGraw-Hill.
- ⁵³ Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2020). CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02934>
- ⁵⁴ Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- ⁵⁵ Newire, E., Aydin, A., Juma, S., Enne, V. I., & Roberts, A. P. (2020). Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System Located Exclusively on *IncHI1B/IncFIB* Plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01937>

- ⁵⁶ Pinilla-Redondo, R., Russel, J., Mayo-Muñoz, D., Shah, S. A., Garrett, R. A., Nesme, J., Madsen, J. S., Fineran, P. C., & Sørensen, S. J. (2022). CRISPR-Cas systems are widespread accessory elements across bacterial and archaeal plasmids. *Nucleic acids research*, 50(8), 4315–4328. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab859>
- ⁵⁷ Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *Journal of medical microbiology*, 66(5), 551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
- ⁵⁸ Leshner G. Y., Froelich E. J., Roelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., & Brundage, R. P. (1962). 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry*, 91, 1063–1065. <https://doi.org/10.1021/jm01240a021>
- ⁵⁹ Ruiz J. (2019). Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00007-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-19>
- ⁶⁰ Vieira, D. C., Lima, W. G., & de Paiva, M. C. (2020). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Molecular biology reports*, 47(2), 1471–1483. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05220-9>
- ⁶¹ Alós J. I. (2003). Quinolonas [Quinolones]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 21(5), 261–272. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72932-2](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72932-2)
- ⁶² Rodríguez-Martínez, J. M., Cano, M. E., Velasco, C., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 17(2), 149–182. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>
- ⁶³ Ruiz, J., Pons, M. J., & Gomes, C. (2012). Transferable mechanisms of quinolone resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 40(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.02.011>
- ⁶⁴ Andriole V. T. (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 Suppl 2, S113–S119. <https://doi.org/10.1086/428051>
- ⁶⁵ Ince, D., & Hooper, D. C. (2003). Quinolone resistance due to reduced target enzyme expression. *Journal of bacteriology*, 185(23), 6883–6892. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6883-6892.2003>
- ⁶⁶ Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet (London, England)*, 351(9105), 797–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
- ⁶⁷ Rodríguez-Martínez, J. M., Machuca, J., Cano, M. E., Calvo, J., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2016). Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 29, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.001>
- ⁶⁸ Saba Villarroel, P. M., Gutkind, G. O., Di Conza, J. A., & Radice, M. A. (2017). First survey on antibiotic resistance markers in Enterobacteriaceae in Cochabamba, Bolivia. *Revista Argentina de microbiología*, 49(1), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.002>
- ⁶⁹ Rincón, G., Radice, M., Giovanakis, M., Di Conza, J. A., & Gutkind, G. (2014). First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in Escherichia coli clinical isolate ST68, in South America. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 79(1), 70–72. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.007>
- ⁷⁰ Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial resistance and infection control*, 8, 44. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3>

- ⁷¹ Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J., & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(6), e02629-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>
- ⁷² López, M., Rojo-Bezares, B., Chichón, G., & Sáenz, Y. (2022). Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of *CrpP* and Mobilizable ICES. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1271. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091271>
- ⁷³ Jacoby, G. A., Strahilevitz, J., & Hooper, D. C. (2014). Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology spectrum*, 2(5), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013>
- ⁷⁴ Albornoz, E., Lucero, C., Romero, G., Quiroga, M. P., Rapoport, M., Guerriero, L., Andres, P., Rodriguez, C., Galas, M., Centrón, D., Corso, A., & Petroni, A. (2017). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria from Argentina. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(2), 177–187. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0033>
- ⁷⁵ Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet. Infectious diseases*, 6(10), 629–640. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0)
- ⁷⁶ Kim, H. B., Park, C. H., Kim, C. J., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 639–645. <https://doi.org/10.1128/AAC.01051-08>
- ⁷⁷ Poirel, L., Pitout, J. D., Calvo, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Church, D., & Nordmann, P. (2006). In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4), 1525–1527. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1525-1527.2006>
- ⁷⁸ Warburg, G., Korem, M., Robicsek, A., Engelstein, D., Moses, A. E., Block, C., & Strahilevitz, J. (2009). Changes in aac(6')-Ib-cr prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia coli* collected from 1991 through 2005. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(3), 1268–1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.01300-08>
- ⁷⁹ Strahilevitz, J., Engelstein, D., Adler, A., Temper, V., Moses, A. E., Block, C., & Robicsek, A. (2007). Changes in qnr prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. collected from 1990 to 2005. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 3001–3003. <https://doi.org/10.1128/AAC.00256-07>
- ⁸⁰ Rodríguez-Martínez, J. M., Pichardo, C., García, I., Pachón-Ibañez, M. E., Docobo-Pérez, F., Pascual, A., Pachón, J., & Martínez-Martínez, L. (2008). Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(7), 691–697. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02020.x>
- ⁸¹ Dominguez, J. E., Redondo, L. M., Figueroa Espinosa, R. A., Cejas, D., Gutkind, G. O., Chacana, P. A., Di Conza, J. A., & Fernández Miyakawa, M. E. (2018). Simultaneous Carriage of *mcr-1* and Other Antimicrobial Resistance Determinants in *Escherichia coli* From Poultry. *Frontiers in microbiology*, 9, 1679. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01679>
- ⁸² Quiroga, M. P., Andres, P., Petroni, A., Soler Bistué, A. J., Guerriero, L., Vargas, L. J., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M. E., Galas, M., & Centrón, D. (2007). Complex class 1 integrons with diverse variable regions, including aac(6')-Ib-cr, and a novel allele, qnrB10, associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(12), 4466–4470. <https://doi.org/10.1128/AAC.00726-07>

- ⁸³ Andres, P., Lucero, C., Soler-Bistué, A., Guerriero, L., Albornoz, E., Tran, T., Zorreguieta, A., PMQR Group, Galas, M., Corso, A., Tolmasky, M. E., & Petroni, A. (2013). Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(6), 2467–2475. <https://doi.org/10.1128/AAC.01615-12>
- ⁸⁴ Hammerl, J. A., Beutlich, J., Hertwig, S., Mevius, D., Threlfall, E. J., Helmuth, R., & Guerra, B. (2010). pSGI15, a small ColE-like qnrB19 plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(1), 173–175. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp383>
- ⁸⁵ Karczmarczyk, M., Martins, M., McCusker, M., Mattar, S., Amaral, L., Leonard, N., Aarestrup, F. M., & Fanning, S. (2010). Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS microbiology letters*, 313(1), 10–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02119.x>
- ⁸⁶ Pallecchi, L., Riccobono, E., Sennati, S., Mantella, A., Bartalesi, F., Trigoso, C., Gotuzzo, E., Bartoloni, A., & Rossolini, G. M. (2010). Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the qnrB19 gene in commensal enterobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(2), 678–682. <https://doi.org/10.1128/AAC.01160-09>
- ⁸⁷ Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Fernandez, C., Bartalesi, F., Rodriguez, H., Gotuzzo, E., Bartoloni, A., & Rossolini, G. M. (2011). Small qnrB-harboring ColE-like plasmids widespread in commensal enterobacteria from a remote Amazonas population not exposed to antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(5), 1176–1178. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr026>
- ⁸⁸ Folster, J. P., Pecic, G., Bowen, A., Rickert, R., Carattoli, A., & Whichard, J. M. (2011). Decreased susceptibility to ciprofloxacin among *Shigella* isolates in the United States, 2006 to 2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(4), 1758–1760. [https://doi.org/10.1128/AAC.01463-10Fortini 2012, JAC 66\(6\) 1269-72](https://doi.org/10.1128/AAC.01463-10Fortini 2012, JAC 66(6) 1269-72)
- ⁸⁹ Fortini, D., Fashae, K., García-Fernández, A., Villa, L., & Carattoli, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance and β -lactamases in *Escherichia coli* from healthy animals from Nigeria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(6), 1269–1272. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr085>
- ⁹⁰ Cordeiro, N. F., Nabón, A., García-Fulgueiras, V., Álvez, M., Sirok, A., Camou, T., & Vignoli, R. (2016). Analysis of plasmid-mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011–2013. *Journal of global antimicrobial resistance*, 6, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.06.002>
- ⁹¹ Tyson, G. H., Tate, H. P., Zhao, S., Li, C., Dessai, U., Simmons, M., & McDermott, P. F. (2017). Identification of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Salmonella* Isolated from Swine Ceca and Retail Pork Chops in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), e01318-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01318-17>
- ⁹² Elnekave, E., Hong, S. L., Lim, S., Hayer, S. S., Boxrud, D., Taylor, A. J., Lappi, V., Noyes, N., Johnson, T. J., Rovira, A., Davies, P., Perez, A., & Alvarez, J. (2019). Circulation of Plasmids Harboring Resistance Genes to Quinolones and/or Extended-Spectrum Cephalosporins in Multiple *Salmonella enterica* Serotypes from Swine in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(4), e02602-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02602-18>
- ⁹³ Cattoir, A. I., Pezoa, D., Sepúlveda, V., González, I., Rivera, D., Retamal, P., Navarrete, P., Reyes-Jara, A., & Toro, M. (2019). Transduction as a Potential Dissemination Mechanism of a Clonal qnrB19-Carrying Plasmid Isolated From *Salmonella* of Multiple Serotypes and Isolation Sources. *Frontiers in microbiology*, 10, 2503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02503>
- ⁹⁴ Tran, T., Andres, P., Petroni, A., Soler-Bistué, A., Albornoz, E., Zorreguieta, A., Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D. J., Corso, A., & Tolmasky, M. E. (2012). Small plasmids harboring qnrB19: a model for plasmid evolution mediated by site-

specific recombination at oriT and Xer sites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 1821–1827. <https://doi.org/10.1128/AAC.06036-11>

⁹⁵ Cattoir, V., Nordmann, P., Silva-Sanchez, J., Espinal, P., & Poirel, L. (2008). ISEcp1-mediated transposition of qnrB-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(8), 2929–2932. <https://doi.org/10.1128/AAC.00349-08>

⁹⁶ Rice, L. B., Carias, L. L., Hutton, R. A., Rudin, S. D., Endimiani, A., & Bonomo, R. A. (2008). The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9), 3427–3429. <https://doi.org/10.1128/AAC.00493-08>

⁹⁷ Dionisi, A. M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Luzzi, I., & Villa, L. (2009). Characterization of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrB19 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 4019–4021. <https://doi.org/10.1128/AAC.00294-09>

⁹⁸ Seija, V., Medina Presentado, J. C., Bado, I., Papa Ezdra, R., Batista, N., Gutierrez, C., Guirado, M., Vidal, M., Nin, M., & Vignoli, R. (2015). Sepsis caused by New Delhi metallo- β -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: case report and literature review. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 30, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.09.010>

⁹⁹ Albornoz, E., Lucero, C., Romero, G., Rapoport, M., Guerriero, L., Andres, P., WHONET-Argentina Group, Galas, M., Corso, A., & Petroni, A. (2014). Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe Proteaeae from Argentina: First report of qnrD in the Americas. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.05.005>

¹⁰⁰ Cunha, M. P. V., Davies, Y. M., Cerdeira, L., Dropa, M., Lincopan, N., & Knöbl, T. (2017). Complete DNA Sequence of an IncM1 Plasmid Bearing the Novel *qnrE1* Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Variant and *bla*_{CTX-M-8} from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(9), e00592-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00592-17>

¹⁰¹ Soares, F. B., Camargo, C. H., Cunha, M., de Almeida, E. A., Bertani, A., Carvalho, E., de Paiva, J. B., Fernandes, S. A., & Tiba-Casas, M. R. (2019). Co-occurrence of qnrE1 and blaCTX-M-8 in IncM1 transferable plasmids contributing to MDR in different *Salmonella* serotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 74(4), 1155–1156. <https://doi.org/10.1093/jac/dky516>

¹⁰² Coppola, N., Freire, B., Umpiérrez, A., Cordeiro, N. F., Ávila, P., Trenchi, G., Castro, G., Casaux, M. L., Fraga, M., Zunino, P., Bado, I., & Vignoli, R. (2020). Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia coli* Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay. *Frontiers in veterinary science*, 7, 588919. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.588919>

¹⁰³ Wang, C., Yin, M., Zhang, X., Guo, Q., & Wang, M. (2021). Identification of *qnrE3* and *qnrE4*, New Transferable Quinolone Resistance *qnrE* Family Genes Originating from *Enterobacter mori* and *Enterobacter asburiae*, Respectively. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(8), e0045621. <https://doi.org/10.1128/AAC.00456-21>

¹⁰⁴ Quiroga, M. P., Orman, B., Errecalde, L., Kaufman, S., & Centrón, D. (2015). Characterization of Tn6238 with a new allele of aac(6')-Ib-cr. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2893–2897. <https://doi.org/10.1128/AAC.03213-14>

¹⁰⁵ Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., & Torres, C. (2012). qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(4), 886–897. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr548>

- ¹⁰⁶ Boyd, D. A., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M. P., Willey, B. M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., & Mulvey, M. R. (2004). Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(10), 3758–3764. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3758-3764.2004>
- ¹⁰⁷ Kim, H. B., Wang, M., Park, C. H., Kim, E. C., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2009). *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3582–3584. <https://doi.org/10.1128/AAC.01574-08>
- ¹⁰⁸ Norman, A., Hansen, L. H., She, Q., & Sørensen, S. J. (2008). Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*, 60(1), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.03.003>
- ¹⁰⁹ Albornoz, E., Romero, G., Corso, A., & Petroni, A. (2014). First report of *oqxAB* in clinical *Escherichia coli* from Argentina. *54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), abstr. Conference: 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC; abstr. POC-001)*; Washington, DC, Estados Unidos. DOI: 10.13140/2.1.1963.8721
- ¹¹⁰ Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 32nd informational supplement (February 16, 2022) M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2022.
- ¹¹¹ Melano, R., Corso, A., Petroni, A., Centrón, D., Orman, B., Pereyra, A., Moreno, N., & Galas, M. (2003). Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(1), 36–42. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg281>
- ¹¹² <https://github.com/rrwick/Porechop>
- ¹¹³ Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B. J., Waite, D., & Davey, R. P. (2013). Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Frontiers in genetics*, 4, 288. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00288>
- ¹¹⁴ <https://github.com/sanger-pathogens/assembly-stats>
- ¹¹⁵ Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- ¹¹⁶ Hunt, M., Mather, A. E., Sánchez-Busó, L., Page, A. J., Parkhill, J., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2017). ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial genomics*, 3(10), e000131. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>
- ¹¹⁷ <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>
- ¹¹⁸ Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS computational biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- ¹¹⁹ Wick, R. R., & Holt, K. E. (2022). Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies. *PLoS computational biology*, 18(1), e1009802. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009802>
- ¹²⁰ <https://github.com/rrwick/Tricycler/wiki/How-to-run-Tricycler>

- ¹²¹ Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- ¹²² Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder - an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- ¹²³ Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., & Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific reports*, 11(1), 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- ¹²⁴ Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- ¹²⁵ Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2018). oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic acids research*, 46(W1), W229–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>
- ¹²⁶ Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gki014>
- ¹²⁷ Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A., & Hallet, B. (2015). The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology spectrum*, 3(4), 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014>
- ¹²⁸ Néron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in Klebsiella. *Microorganisms*, 10(4), 700. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040700>
- ¹²⁹ Nawrocki, E. P., & Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(22), 2933–2935. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt509>
- ¹³⁰ Hyatt, D., Chen, G. L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- ¹³¹ Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(4), 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- ¹³² Li H. (2021). New strategies to improve minimap2 alignment accuracy. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(23), 4572–4574. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab705>
- ¹³³ Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
- ¹³⁴ Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J., & Holt, K. E. (2015). Bandage: interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(20), 3350–3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>

- ¹³⁵ Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- ¹³⁶ Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M. A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(16), 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>
- ¹³⁷ Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ¹³⁸ Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Ortiz-Alvarado, R., Cervantes, C., Meza-Carmen, V., & Ramírez-Díaz, M. I. (2019). Prevalence of the crpP gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 74(5), 1253–1259. <https://doi.org/10.1093/jac/dky562>
- ¹³⁹ Matsumura, Y., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2018). Complete Genome Sequence of Escherichia coli J53, an Azide-Resistant Laboratory Strain Used for Conjugation Experiments. *Genome announcements*, 6(21), e00433-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00433-18>
- ¹⁴⁰ <https://www.atcc.org/>
- ¹⁴¹ Cameranesi, M. M., Morán-Barrio, J., Limansky, A. S., Repizo, G. D., & Viale, A. M. (2018). Site-Specific Recombination at XerC/D Sites Mediates the Formation and Resolution of Plasmid Co-integrates Carrying a bla_{OXA-58}- and TnaphA6-Resistance Module in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, 9, 66. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00066>
- ¹⁴² Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, 10(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- ¹⁴³ Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J. W., Bourrel, A. S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J. M., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). *mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in Escherichia coli, and Its Origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(9), e00965-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00965-19>
- ¹⁴⁴ Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., & Hooper, D. C. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Escherichia coli from Shanghai, China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(7), 2242–2248. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2242-2248.2003>
- ¹⁴⁵ Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, 10(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- ¹⁴⁶ Garnier, F., Raked, N., Gassama, A., Denis, F., & Ploy, M. C. (2006). Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described Salmonella enterica serovar Keurmassar. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 3200–3202. <https://doi.org/10.1128/AAC.00293-06>
- ¹⁴⁷ Heffron, F., McCarthy, B. J., Ohtsubo, H., & Ohtsubo, E. (1979). DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell*, 18(4), 1153–1163. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90228-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90228-9)
- ¹⁴⁸ Huang, Z., Mi, Z., & Wang, C. (2008). A novel beta-lactamase gene, LAP-2, produced by an Enterobacter cloacae clinical isolate in China. *The Journal of hospital infection*, 70(1), 95–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.04.012>

- ¹⁴⁹ Poirel, L., Cattoir, V., Soares, A., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Novel Ambler class A beta-lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), 631–637. <https://doi.org/10.1128/AAC.01082-06>
- ¹⁵⁰ Poirel, L., Lartigue, M. F., Decusser, J. W., & Nordmann, P. (2005). ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 447–450. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.447-450.2005>
- ¹⁵¹ Partridge S. R. (2007). Genetic environment of ISEcp1 and blaACC-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2658–2659. <https://doi.org/10.1128/AAC.00364-07>
- ¹⁵² Poirel, L., Lartigue, M. F., Decusser, J. W., & Nordmann, P. (2005). ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(1), 447–450. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.447-450.2005>
- ¹⁵³ Zong, Z., Partridge, S. R., & Iredell, J. R. (2010). ISEcp1-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of bla(CTX-M-62) linked to qnrB2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), 3039–3042. <https://doi.org/10.1128/AAC.00041-10>
- ¹⁵⁴ Ramirez, M. S., Nikolaidis, N., & Tolmasky, M. E. (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6')-Ib paradigm. *Frontiers in microbiology*, 4, 121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>
- ¹⁵⁵ Arduino, S. M., Catalano, M., Orman, B. E., Roy, P. H., & Centrón, D. (2003). Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(12), 3945–3949. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3945-3949.2003>
- ¹⁵⁶ Partridge, S. R., Zong, Z., & Iredell, J. R. (2011). Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying blaCTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4971–4978. <https://doi.org/10.1128/AAC.00025-11>
- ¹⁵⁷ He, S., Hickman, A. B., Varani, A. M., Siguier, P., Chandler, M., Dekker, J. P., & Dyda, F. (2015). Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *mBio*, 6(3), e00762. <https://doi.org/10.1128/mBio.00762-15>

1 Anexo

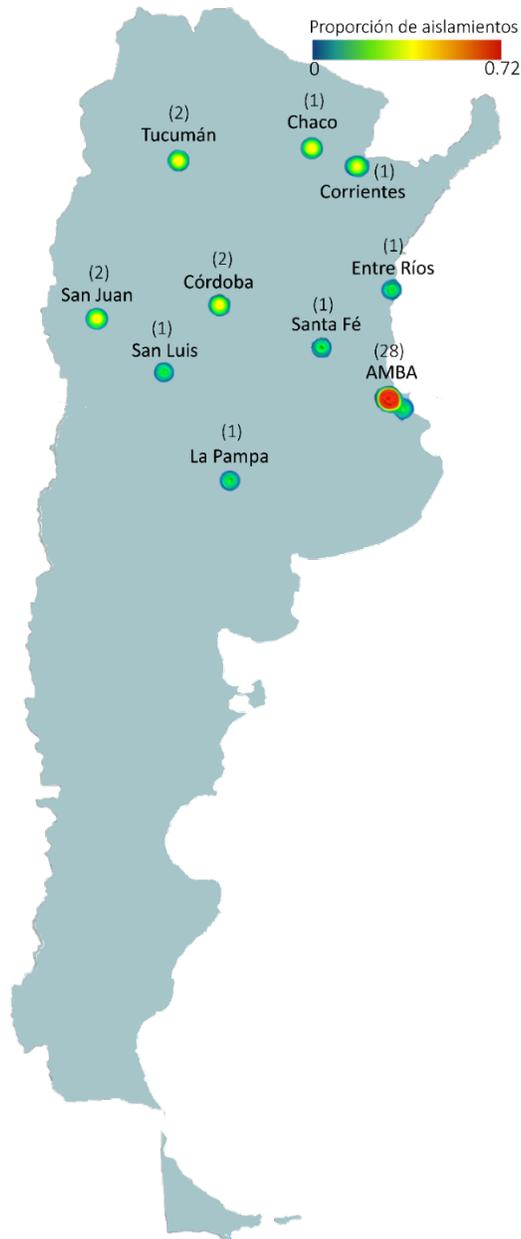
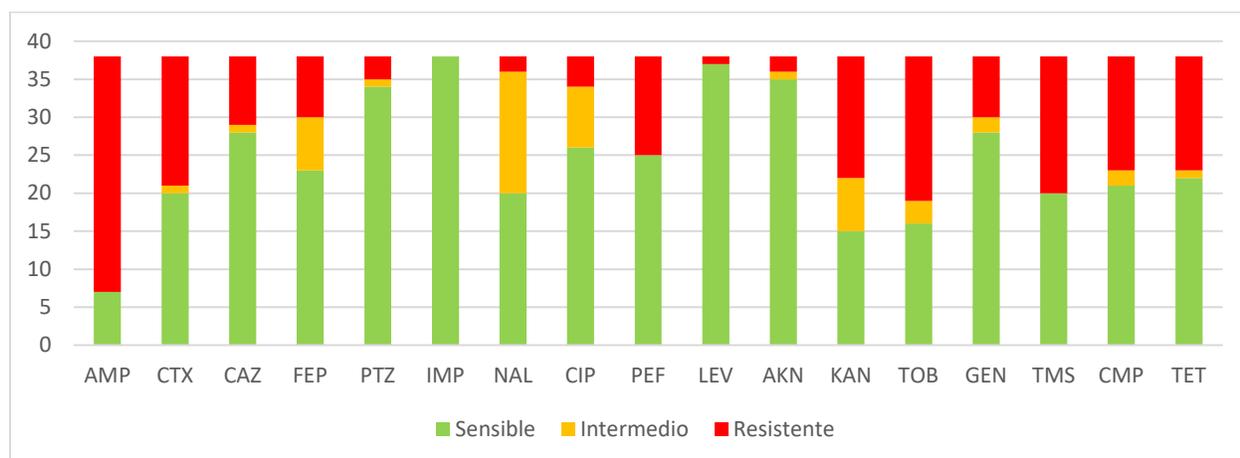


Figura S1. Localización de hospitales en los que se recolectaron los 40 aislamientos clínicos seleccionados para la construcción de la plasmoteca. El número de hospitales de cada jurisdicción se indica entre paréntesis. El porcentaje de aislamientos de cada jurisdicción, se indica con los círculos coloreados de acuerdo a una escala de temperatura mostrada en la Figura.

Figura S2: Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de las transconjugantes.



Para cada antibiótico se muestra el porcentaje de transconjugantes con resultados sensible, intermedio y resistente. Abreviaturas: AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftacidima; FEP, cefepime; PTZ, piperacilina-tazobactam, IMP, imipenem; NAL, Ácido Nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; PEF, pefloxacina; LEV, levofloxacina; AKN, amikacina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; TMS trimetoprima-sulfometoxazol; CMP, cloranfenicol; TET, tetraciclina.

Tabla S1: Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de las transconjugantes. Para cada antibiótico, se indica el diámetro del halo de inhibición (en mm), con la interpretación en las categorías sensible, intermedia y resistente, mediante los colores verde, amarillo y rojo, respectivamente. Abreviaturas: AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftacidima; FEP, cefepime; PTZ, piperacilina-tazobactam, IMP, imipenem; NAL, Ácido Nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; PEF, pefloxacina; LEV, levofloxacina; AKN, amikacina; KAN, kanamicina; TOB, tobramicina; GEN, gentamicina; TMS trimetoprima-sulfometoxazol; CMP, cloranfenicol; TET, tetraciclina.

Ceipa	Esp.	AMP	CTX	CAZ	FEP	PTZ	BLEE	IMP	NAL	CIP	PEF	LEV	AKN	KAN	TOB	GEN	TMS	CMP	TET
M9921	Eko	6	8	6	15	20	+	17	19	18	21/3 4	25	21	6	6	14	6	6	25
TC-M23665		6	18	10	23	32	+	30	18	22	25	24/3 1	21	7	8	15	6	6	27
M9167	Kpn	6	10	19	16	19	+	29	11	13	11	16	15	6	8	6	6	18	6
TC-M23740		12	35	33	37	33	-	31	18	24/3 4	20	25	28	28	22	26	6	23	7
M9314	Kpn	6	6	18	13	19	+	29	16	14	19	23	22	15	9	21	16	6	24
TC-M23667		6	11	25	16	26	+	32	18	20	23	30	28	18	18	25	32	22	28
M9902	Eco	6	6	13	14	20	+	29	16	17	29	29	20	12	7	23	6	27	6
TC-M9979		6	6	15	16	22	+	32	15	20	26	33	23	16	9	25	6	27	6
M9820	Eco	6	18	27	22	20	+	29	14	22	23	22	22	17	23	23	27	23	22
TC-M11894		6	36	30	35	22	-	31	10	23	22	23	27	27	26	27	31	20	23
M11059	Eco	6	34	29	36	29	-	32	16	26	23	26	21	20	20	20	6	20	23
TC-M23539		23	35	35	38	32	NC	32	15	26/3 5	22	24/3 2	29	27	23	26	31	22	27
M9518	Eae	6	11	21	15	12	+	25	19	15	22	26	17	6	6	13	6	21	24
TC-M23227		6	13	28	18	14	+	28	23	28	31/3 7	30	21	10	8	21	25	8	29
M9932	Kpn	6	28	28	27	18	-	28	17	15	15	23	21	14	11	21	25	26	7
TC-M23090		6	33	32	28	22	-	31	13	21	18	22/2 8	23	13	15	26	28	22	7
M9306	Kpn	6	6	12	12	16	+	27	24	26	29	33	18	6	6	6	6	26	6
TC-M23172		6	10	16	18	23	+	31	25	34	31	34/4 4	22	16	13	11	29	26	8
M9272	mmo	6	36	32	36	33	-	22	6	6	14	20	22	15	11	22	24	12	7
TC-M23153		6	38	35	35	28	-	31	25	32	33	36/4 4	20	14	11	23	30	26	29
M9684	Sma	6	6	6	11	15	+	29	6	9	11	17	12	6	6	6	6	6	17

TC-M23252		6	20	15	21	28	+	31	21	23	24	$\frac{24}{3}$ 1	22	8	8	15	6	6	27
M7916	#REF	6	7	7	13	16	+	26	19	27	25	29	13	6	6	6	6	6	29
TC-M23226		6	21	11	23	32	+	33	20	$\frac{29}{4}$ 0	25	$\frac{27}{3}$ 8	22	8	10	14	6	6	25
M11085	kpn	6	17	13	24	24	+	26	16	25	18	20	14	6	9	21	18	9	27
TC-M23174		6	20	12	27	31	+	33	16	$\frac{25}{3}$ 3	22	$\frac{24}{3}$ 1	17	9	12	22	23	6	29
M9966	Sal	6	35	32	37	28	-	34	15	26	22	25	25	25	19	25	6	6	6
TC-M23152		6	36	32	36	30	-	32	18	$\frac{28}{3}$ 8	25	$\frac{25}{3}$ 0	27	30	20	20	6	6	6
Q3039	Ecl	6	6	6	19	11	-	24	6	6	5	8	6	6	6	6	6	10	15
TC-M23125		6	37	33	35	26	-	30	24	30	31	$\frac{34}{4}$ 4	6	6	6	6	29	11	25
Q3108	Kox	6	10	6	14	12	+	21	6	14	13	16	15	11	10	6	23	11	6
TC-M23097		6	35	38	25	17	-	29	23	31	31	$\frac{32}{4}$ 0	23	17	14	21	30	17	28
Q1211	kpn	6	12	6	20	13	+	24	6	6	6	6	18	6	6	6	6	6	24
TC-M23202		6	20	14	26	27	+	32	21	28	24	26	23	6	22	20	22	6	28
Q1187	Eco	6	28	30	25	14	-	31	6	6	6	10	15	8	6	21	23	23	8
TC-M23337		6	30	33	26	20	NC	28	24	31	36	$\frac{33}{4}$ 3	22	14	12	24	26	22	7
Q4134	Eco	6	38	35	35	33	-	33	6	6	6	9	11	6	6	14	6	28	7
TC-M23338		25	38	34	35	31	NC	33	24	32	31	$\frac{34}{4}$ 3	21	13	11	23	6	22	7
Q3094	kpn	6	8	18	12	10	+	26	6	6	6	6	21	6	9	6	6	6	19
TC-M23384		6	15	30	19	23	+	30	24	36	36	$\frac{33}{4}$ 4	25	19	16	25	33	24	28
Q5005	Ecl	6	30	25	14	21	-	30	6	6	6	10	12	6	8	19	6	6	9
TC-M23386		6	36	32	27	26	-	31	26	31	39	$\frac{35}{4}$ 4	20	10	10	25	6	21	27
Q2108	kpn	6	10	16	13	21	+	30	6	6	6	6	6	6	6	17	6	7	23

TC-M23382		6	13	29	21	28	+	31	20	32/3 9	26	26/3 4	17	9	10	20	30	6	26
M9863	kpn	6	12	19	21	22	+	28	11	12	15	18	21	13	11	9	6	26	7
TC-M23404		6	12	22	24	25	+	31	20	24	28	29/3 6	23	18	14	10	6	20	29
M9992	kpn	6	6	6	13	17	+	25	20	24	30	27	16	6	6	6	22	9	28
TC-M23408		6	12	6	18	26	+	31	25	28	30/3 5	32/4 2	22	15	9	21	30	6	27
Q4020	Kox	6	36	33	36	27	-	30	21	27	25	27	24	24	23	24	6	29	7
TC-M23381		20	35	38	37	27	-	31	16	29/3 8	25	26/3 4	27	26	24	24	6	24	7
M11007	Kox	7	37	32	35	28	-	31	17	20	16	21	25	24	24	23	6	21	6
TC-M23407		12	33	34	35	32	-	33	16	24/3 2	18	24/3 0	30	26	22	24	22	23	7
Q5029	Ecl	6	6	6	31	19	-	30	6	6	6	6	19	9	9	13	6	6	21
TC-M23426		22	32	30	38	33	NC	33	17	28	25	28	21	26	9	16	6	6	28
Q4143	Cfr	6	6	12	10	15	+	25	6	6	6	6	6	6	6	6	6	15	7
TC-M11222		6	8	24	18	24	+	30	18	26	26	32	6	6	6	6	30	6	24
M9828	kpn	6	6	11	14	17	+	27	20	27	19	27	19	10	6	14	6	6	10
TC-M23438		6	12	21	18	22	+	32	25	32	36	34	25	6	12	10	32	21	14
TC-M23439		19	38	38	36	30	-	33	16	28/3 5	22	24/3 0	29	15	22	23	6/23	13	29
M7943	kva	6	8	14	15	12	+	26	8	6	10	14	16	6	9	18	6	6	8
TC-M23825		6	31	37	28	20	-	32	17	22	26	27/3 2	22	7	6	26	30	19	30
Q5099	kpn	6	6	6	15	13	+	30	6	6	6	6	26	21	15	8	6	6	6
TC-M23428		6	12	7	18		+	30	16	28/3 5	24	25/3 1	25	32		24	6		
Q4016	kpn	6	8	17	13	16	+	28	6	6	6	6	14	6	6	6	6	6	22
TC-M23827		6	15	30	22	24	+	33	21	30/3 8	30	27/3 5	21	6	8	7	6	6	31

Q1130	<i>Kpn</i>	6	24	26	28	17	+	27	14	22	20	22	21	15	10	6	6	26	6	
TC-M15051		6	27	32	34	25	+	30	14	$\frac{26}{4}$ 5	21	$\frac{23}{3}$ 5	24	20	15	7	18	25	6	
M9257	<i>Kpn</i>	14	38	33	32	25	-	27	11	15	15	16	21	18	18	21	24	26	6	
TC-M21844		23	39	36	41	34	-	33	14	$\frac{27}{3}$ 8	21	$\frac{26}{3}$ 1	29	28	26	26	35	25	6	
M17464	<i>Ecl</i>	6	6	6	10	6		13	10	20	14	16	6	6	6	6	6	6	6	14
TC-M25208		6	6	6	19	15		20	15	$\frac{28}{3}$ 3	21	30	6	6	6	6	6	6	6	27
M17277	<i>Kpap</i>	6	6	6	11	6	+	14	6	9	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6
TC-M25520		6		19	32	31		28	20	$\frac{30}{4}$ 0	25	$\frac{30}{3}$ 8	28	24	17	7	6	6	6	6
TC-M25207		24	42	38	42	32	-	35	16	28	26	$\frac{29}{3}$ 5	18	25	20	26	6/29	6	6	6
M21014	<i>Kpn</i>	6	24	24	23	9	-	17	6	6	6	7	17	9	6	6	6	6	6	6
M21217		6	37	34	36	21	-	27	22	22	21	$\frac{25}{3}$ 0	25	13	7	14	6	21	6	6
M22246	<i>Pst</i>	6	27	24	25	21	-	21	6	6	6	6	25	22	10	13	6	6	6	6
M22714		6	34	28	37	24	-	28	27	27	1	$\frac{25}{3}$ 0	25	28	22	25	6	22	6	6
M21692	<i>Ecl</i>	6	10	6	12	8	-	24	11	12	12	19	17	9	7	19	6	19	6	6
Q4160	<i>Eco</i>	6	9	20	17	27	+	27	6	23	13	18	24	6	7	12	6	15	6	6