

































































































































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

### (b) *aac(6')-Ib-cr*

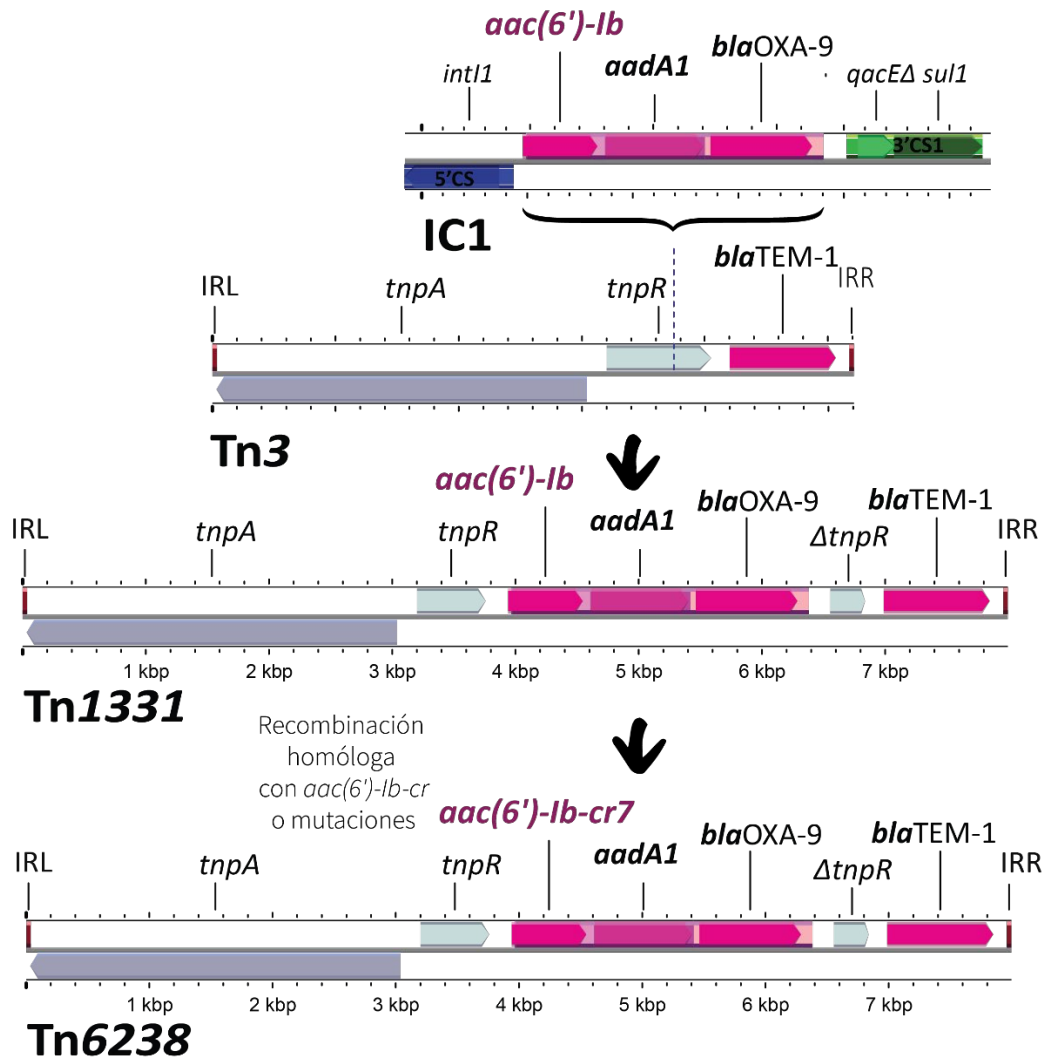
En cuanto al gen ***aac(6')-Ib-cr***, se encontró en 3 entornos genéticos distintos:

(a) como primer casete de IC1 o ICC1, por ejemplo, en In37::ISCR1::*qnrB10* o In37::ISCR1::*qnrA1*, ya mencionados<sup>82</sup>

(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*.<sup>104</sup> (Figura 28)

(c) asociado a IS26 y *bla*<sub>OXA-1</sub>.<sup>74, 105, 106</sup>

El gen *aac(6')-Ib-cr* está ampliamente diseminado en Latinoamérica y el mundo.<sup>60 59, 67</sup>



**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.<sup>104</sup>

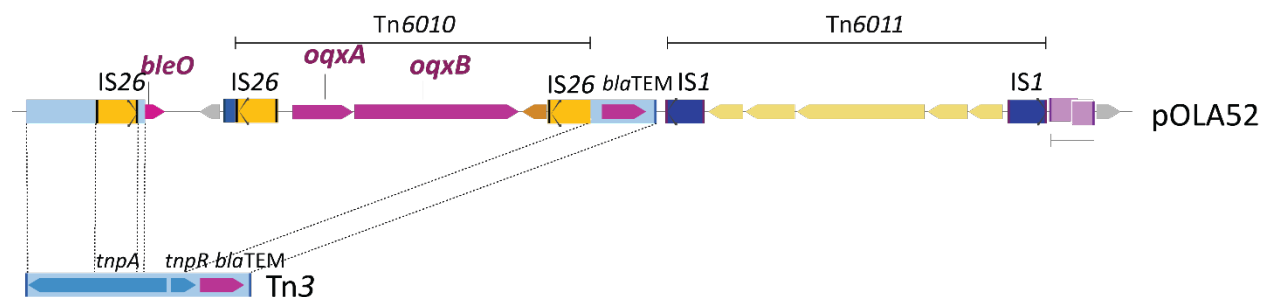
### (c) *qepA*

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.<sup>63</sup> Estos PMQRs no son muy frecuentes, en especial en Latinoamérica, donde sólo hubo pocos reportes de Argentina, Bolivia y México.<sup>60</sup>

(d) *oqxAB*

El operón ***oqxAB*** es ubicuo en algunas Enterobacterales: 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.<sup>107</sup> 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).<sup>108</sup> 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.<sup>107</sup> En un plásmido de *Salmonella*, se encontró la misma estructura de 10 kb,  $\Delta$ 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.<sup>108</sup>

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.<sup>60</sup>

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 Enterobacterales diferentes de *Klebsiella spp.*<sup>109</sup>

## 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 Enterobacterales 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*.<sup>74, 82, 83, 94, 99, 109</sup> 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 Enterobacterales 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.<sup>74, 82, 83, 94, 99, 109</sup> 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.<sup>83</sup> 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-Argentina<sup>1</sup> (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 genes<sup>74</sup>. 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*.<sup>82</sup>

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 descriptos 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

---

<sup>1</sup> 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.<sup>110</sup> 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.<sup>110</sup>

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

### Sección 3.03 Conjugaciones biparentales

Se realizaron ensayos de conjugación biparental de acuerdo a un método descrito previamente<sup>111</sup>, 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.<sup>31</sup>

### 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                          | Amplicón | Nombre del primer | Secuencia                       | Temperatura de Annealing (°C) |
|------------------------------|----------|-------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <i>qnrA</i>                  | 680      | <i>qnrNEW-F</i>   | 5'-CCCTGATTAAAGGAAGCCGT-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'-TAAATTGGCACCCTGTAGGC-3'      |                               |
| <i>aacCR</i>                 | 277      | <i>aac-cr-F</i>   | 5'-GCTCTTGGAAGCGGGGACGAAA-3'    | 55                            |
|                              |          | <i>aac-cr-R</i>   | 5'-GAACCATGTACACGGCTGGACCGTA-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'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC-3' | 60                            |
|                              |          | <i>HI2-RV</i>     | 5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'    |                               |
| <i>ORF513</i><br><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 ZnSO<sub>4</sub>, 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.

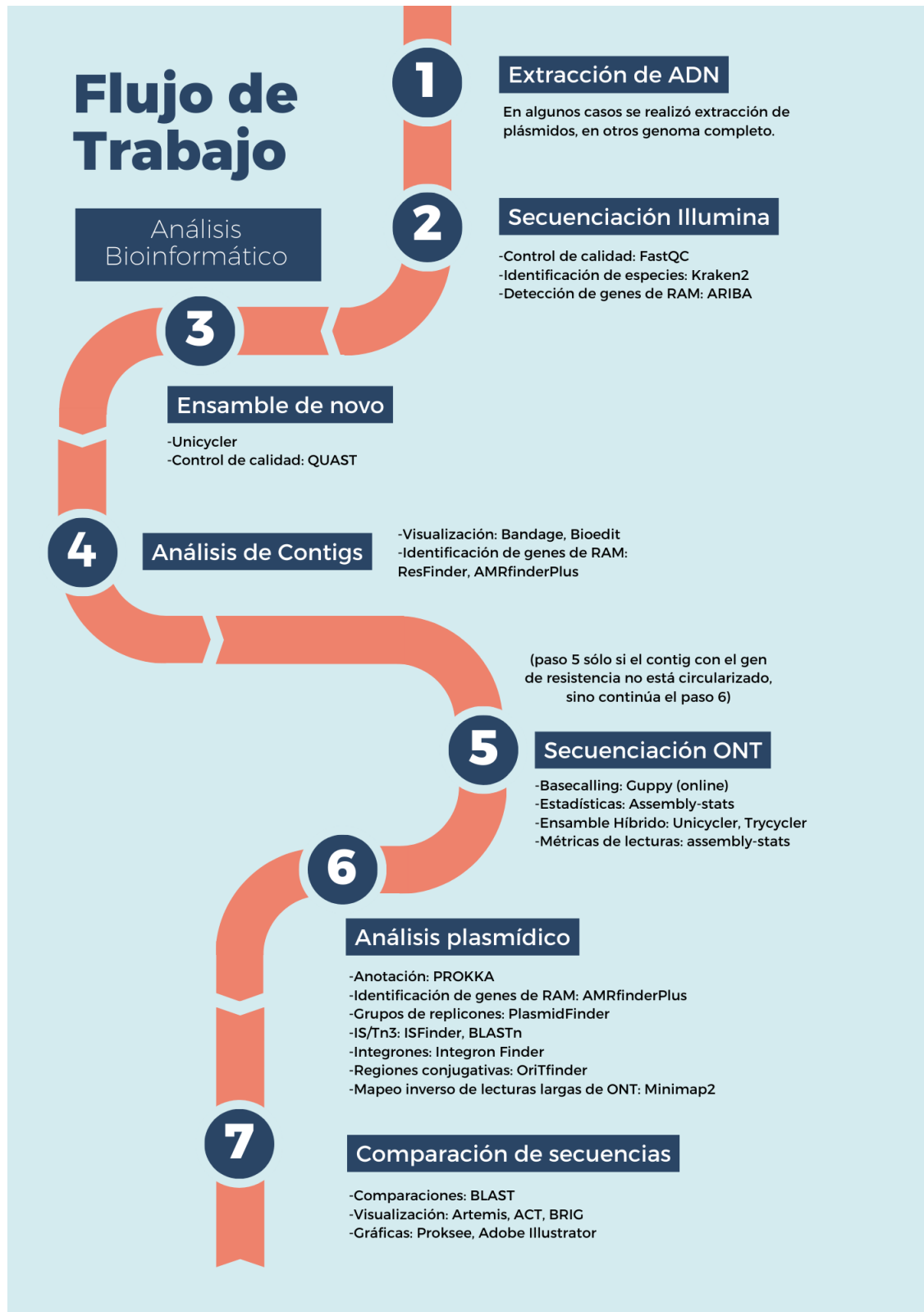


Figura 30. Flujo de trabajo utilizado para el análisis bioinformático de los plásmidos portadores de PMQRs.

## (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 Porehop se procesaron las lecturas obtenidas para identificarlas y luego eliminar los adaptadores.<sup>112</sup>

## Sección 3.08 Análisis bioinformático

### (a) Control de calidad de las lecturas de Illumina

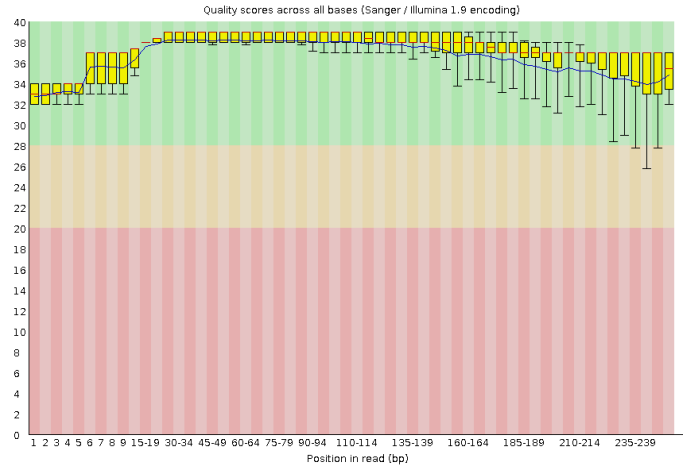
El control de calidad de todas las secuencias obtenidas mediante la tecnología de Illumina se realizó utilizando la herramienta bioinformática FastQC (versión 0.11.5)<sup>113</sup>, que se ejecutó en entorno Windows. Esta herramienta analiza los dos archivos fastq obtenidos en la secuenciación y realiza 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:

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

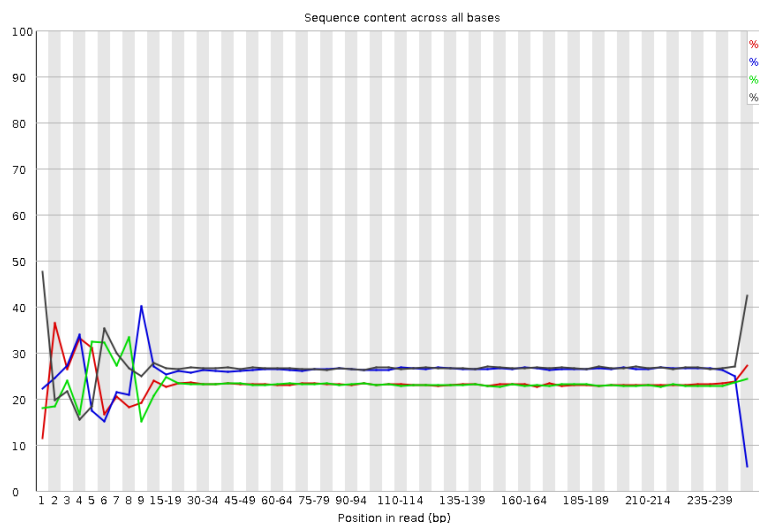
donde P es la probabilidad de error. Por ejemplo, si  $P=0,001$  (1 error en 1.000),  $Q=30$ .



**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.

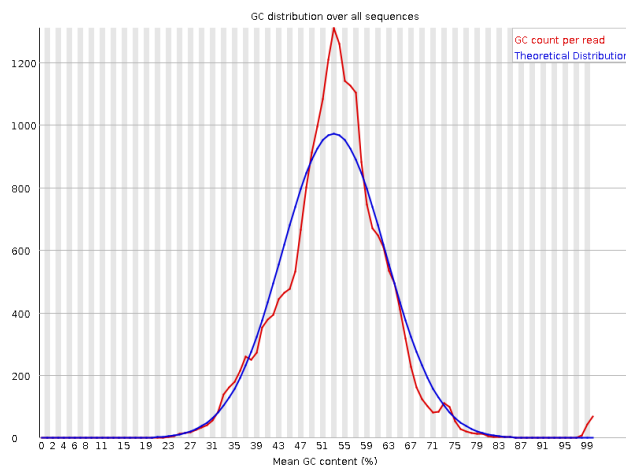
c) Otro análisis de FastQC es la Composición de la secuencia por base (*Per base sequence content*), en el cual se calculó el porcentaje de cada uno de los cuatro nucleótidos en cada posición de todas las lecturas obtenidas (Figura 32).



**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.

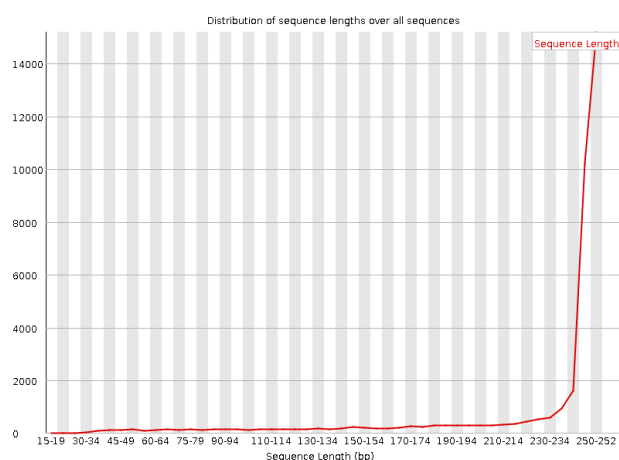
d) En el contenido de GC por secuencia (*Per sequence GC content*), se analizó la distribución de lecturas en función del %GC (Figura 33). Se debería obtener una distribución aproximadamente normal del %GC, en la cual el pico central debería corresponder al %GC de la especie a la cual pertenece el aislamiento 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  $\geq 1\%$ .

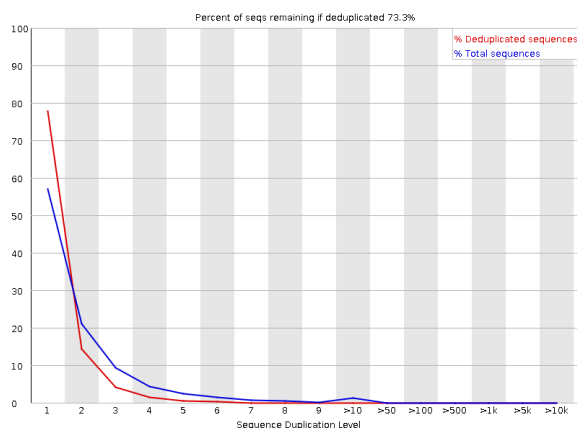
f) En el análisis de Distribución de la longitud de secuencia (*Sequence length distribution*) se evaluó la distribución del largo de todas las lecturas obtenidas en un ensayo de secuenciación (Figura 34). Para establecer la calidad mediante este análisis, se consideró que solo debería observarse un 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

el conjunto final de secuencias. Un bajo nivel de duplicación de secuencias puede indicar un nivel muy alto de cobertura, pero un alto nivel de duplicación indica probablemente alguna clase de sesgo por enriquecimiento, por ejemplo, por sobreamplificación por PCR. En el Análisis de Secuencias duplicadas, se evaluó el porcentaje de secuencias que tuvieron distintos grados de duplicación (Figura 35).



**Figura 35. Distribución de secuencias por grado de duplicación.** La línea azul indica la distribución para el conjunto completo de secuencias, y la línea roja, las secuencias remanentes luego de eliminar los duplicados. En una biblioteca correctamente construida, la mayoría de las secuencias son únicas, y por lo tanto se localizan sobre el extremo izquierdo del gráfico, pero si existen subconjuntos de secuencias enriquecidos, o contaminantes de baja complejidad, se generarán picos en la línea azul, hacia la derecha del gráfico (como el que se observa para duplicación >10), que desaparecerán en la línea roja.

h) Análisis de Secuencias sobrerrepresentadas (*Overrepresented sequences*). Una biblioteca genómica correctamente construida contiene un conjunto muy diverso de secuencias, sin que haya ninguna que esté presente en una pequeña fracción del total. El hecho de que una secuencia individual esté sobrerrepresentada puede deberse a una característica biológicamente relevante del genoma secuenciado (por ejemplo, la existencia de múltiples copias de una IS), o bien a la presencia de contaminantes, o simplemente porque la biblioteca genómica no tiene la diversidad esperada. En el análisis de Secuencias sobrerrepresentadas, FastQC generó una lista de toda secuencia presente en un porcentaje mayor al 0,1% el total. Luego, realizó una búsqueda de cada una de estas secuencias en una base de datos de contaminantes comúnmente encontrados en ensayos de secuenciación, y finalmente reportó el mejor acierto (*hit*) detectado en esa búsqueda (cada *hit* debe tener al menos 20 pb y no más de 1 mismatch) (Figura 36).

| Sequence                                          | Count | Percentage          | Possible Source |
|---------------------------------------------------|-------|---------------------|-----------------|
| GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG | 43    | 0.11559761277488037 | No Hit          |
| GTGCACGCATCACCTCAATACTTTGATGGTGGCGTAAGCCGTCTTCATG | 42    | 0.11290929619872037 | No Hit          |

**Figura 36. Reporte de la herramienta FastQC para el análisis de Secuencias sobrerrepresentadas.** Para cada una de estas secuencias, se indica la cantidad de veces en las que se la encontró; el porcentaje de esta cantidad sobre el total de secuencias, y si se obtuvo algún hit en la búsqueda en base de datos.

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.<sup>114</sup>

## (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.<sup>115</sup>

## (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)<sup>116</sup>. 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 ResFinder<sup>117</sup>:

```
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 ensambles 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).<sup>118</sup>

### (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).<sup>118</sup> 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 ensamble. 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 ensambles 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 Filtlong (versión 0.2.0) para eliminar aquellas lecturas menores a 1000 pb. Luego de obtener el ensamble 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 ensamble mediante la utilización de las lecturas cortas de Illumina<sup>119</sup>. Trycycler se ejecutó en entorno GNU/Linux, los comandos sugeridos por el creador.<sup>120</sup>

El control de calidad de los ensambles *de novo* (realizados con lecturas cortas de Illumina solamente, o por ensamble híbrido) se realizó utilizando las métricas de ensamble, obtenidas mediante QUAST (versión 5.1.0rc1)<sup>121</sup>. 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 ensamble no sea menor al tamaño correspondiente al cromosoma de la especie secuenciada (Por ej,  $\geq 5$  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/>)<sup>122</sup> y AMRFinderPlus (versión 3.10.20)<sup>123</sup>. 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/>)<sup>124</sup>. 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/>)<sup>125</sup>. 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 ISFinder<sup>126</sup> (*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 Tn3<sup>127</sup>, 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](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  $10^5$  / tamaño del plásmido (en pb), lo cual se expresó como N° de IS /  $10^5$  pb.

**E)** La presencia de integrones se determinó con la herramienta bioinformática Integron Finder (citás) (versión 2.0.1).<sup>128, 129, 130</sup> 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

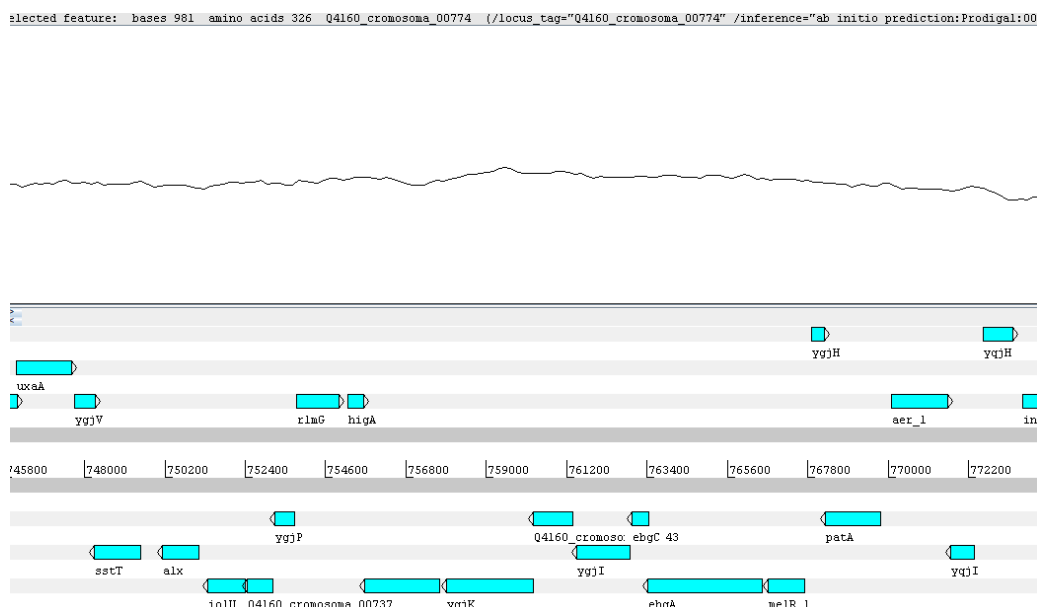
([https://galaxy.pasteur.fr/root?tool\\_id=toolshed.pasteur.fr/repos/khillion/integron\\_finder/integron\\_finder/2.0.1](https://galaxy.pasteur.fr/root?tool_id=toolshed.pasteur.fr/repos/khillion/integron_finder/integron_finder/2.0.1))

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 manual<sup>131</sup>. 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 Minimap2<sup>132</sup>, 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).<sup>133</sup> Para la visualización gráfica de secuencias se utilizó Bandage<sup>134</sup>, la anotación realizada con PROKKA, se analizó con el programa Artemis (versión 17.0.1).<sup>135</sup> Los alineamientos de secuencias se visualizaron gráficamente con los programas *Artemis Comparative Tool* (ACT; versión 17.0.1)<sup>136</sup> y *BLAST Ring Image Generator* (BRIG; versión 0.95)<sup>137</sup>. 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 descriptos 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 descriptos. 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*.<sup>36</sup> 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*.<sup>100</sup>

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. morganii</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 identificaron<sup>2</sup>.<sup>59</sup> 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  |

<sup>2</sup> 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> |
| <b>QnrE1</b>                   | 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                     |

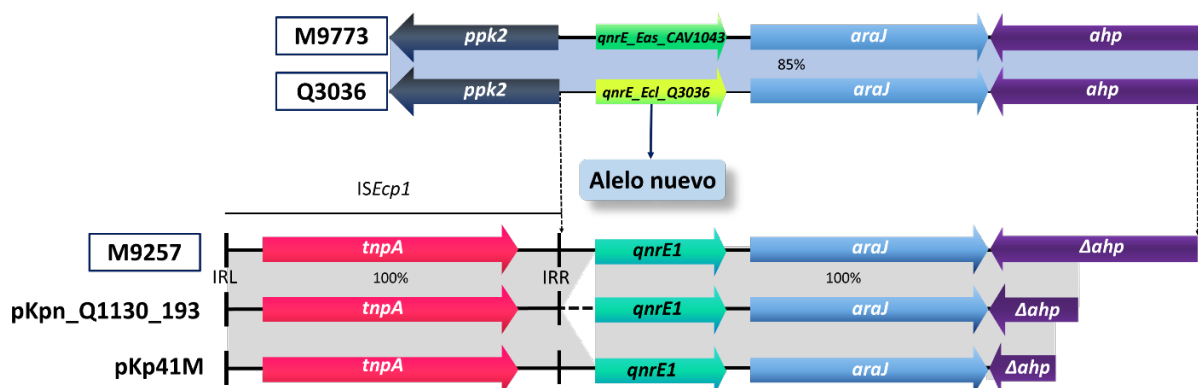
**Figura 38.** Comparación entre diferentes alelos de la familia *qnrE* y sus proteínas inferidas. Arriba se muestra el porcentaje de identidad nucleotídica entre distintos alelos, y abajo el número de aminoácidos de diferencia entre las proteínas inferidas. El mayor porcentaje de identidad para el nuevo 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 hidropoxidasa, respectivamente]. El número de acceso de NCBI-BD para pKp41M es KY781949.

Los hallazgos previos<sup>36</sup> 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.<sup>31</sup> 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).

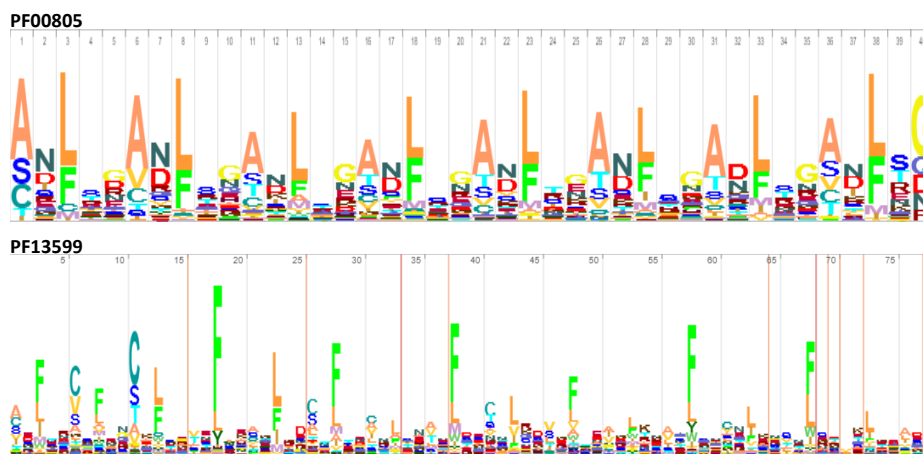


Figura 40. Dominios PF00805 y PF13599 detectados en todas las proteínas Qnr. Se muestran las 40 y 77 posiciones de cada dominio, respectivamente, y en cada posición, se indican los amino ácidos por su código IUPAC, siendo la altura de la letra proporcional a la probabilidad de ocurrencia del amino ácido 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.<sup>138</sup> 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 eflujo.

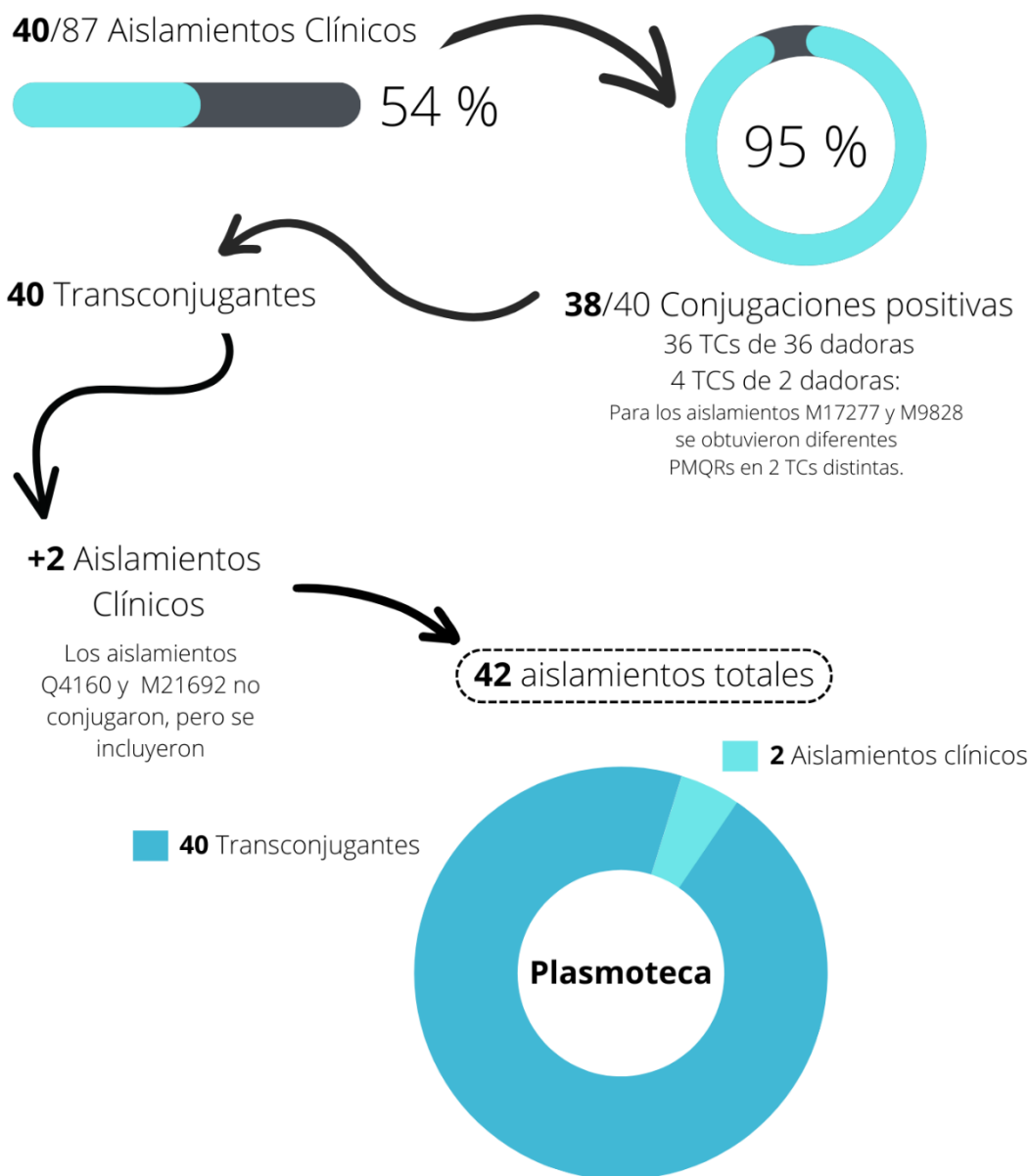
## 5 Resultados Objetivo II

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 Enterobacterales 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 Enterobacterales 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<sup>83, 99</sup>, 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 conjuguar 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 Enterobacterales 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<br>Clínicos | Especie                   | Fecha<br>aislamiento       | Hospital                             | Localización        | Tipo de<br>muestra        | PMQRs                                                |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------------------------------|
| M11007                  | <i>K. oxytoca</i>         | Septiembre<br>2008         | Dr. Juan A.<br>Fernández             | CABA                | orina con sonda           | <i>qnrS1</i>                                         |
| M11059                  | <i>E. coli</i>            | Noviembre<br>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><br><i>qnrB52</i> <i>aac(6')-Ib-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')-Ib-cr5</i>                   |
| M21692                  | <i>E. cloacae</i>         | Octubre 2016<br>Abril 2017 | Eva Perón,<br>San Martín             | CABA                | hemocultivo               | <i>qnrE1</i> <i>aac(6')-Ib-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<br>GBA   | N/C                       | <i>qnrB10</i>                                        |
| M7943                   | <i>K. variicola</i>       | Diciembre 2006             | Favaloro                             | CABA                | hemocultivo               | <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                  |
| M9167                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Abril 2007                 | Rawson<br>Cordoba                    | CORDOBA             | orina con sonda           | <i>qnrS1</i>                                         |
| M9257                   | <i>K. variicola</i>       | Abril 2007                 | Parmenio<br>Piñero                   | CABA                | orina                     | <i>qnrE1</i>                                         |
| M9272                   | <i>M. morgani</i>         | Abril 2007                 | José María<br>Penna                  | CABA                | tejido<br>pseudoaneurisma | <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                                |
| M9306                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Mayo 2005                  | R. Gutiérrez                         | CABA                | líquido<br>cefaloraquídeo | <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                                |
| M9314                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Agosto 2007                | Favaloro                             | CABA                | orina                     | <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                  |
| M9518                   | <i>E. Asburiae</i>        | Enero 2008                 | Dr. Juan A.<br>Fernández             | CABA                | herida quirúrgica         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                                |
| M9684                   | <i>S. marcescens</i>      | Abril 2008                 | Evita                                | Lanus, GBA          | hemocultivo               | <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr7</i>                  |
| M9820                   | <i>E. coli</i>            | Mayo 2008                  | Parmenio<br>Piñero                   | CABA                | líquido abdominal         | <i>qnrB19</i>                                        |
| M9828                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Junio 2008                 | Cuatro de<br>Junio                   | Roque Saenz<br>Peña | orina                     | <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                  |
| M9863                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Julio 2008                 | Masvernat                            | ENTRE RIOS          | absceso, orina            | <i>qnrB1</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                   |
| M9902                   | <i>E. coli</i>            | Agosto 2008                | Dr. Cosme<br>Argerich                | CABA                | líquido abdominal         | <i>qnrB2</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                   |
| M9921                   | <i>E. kobei</i>           | Julio 2008                 | Evita                                | Lanus, GBA          | hemocultivo               | <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr7</i>                  |
| M9932                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Octubre 2008               | Parmenio<br>Piñero                   | CABA                | orina                     | <i>qnrS1</i> <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                   |
| M9966                   | <i>Salmonella spp.</i>    | Agosto 2008                | Evita                                | Lanus, GBA          | coprocultivo              | <i>qnrB2</i>                                         |
| M9992                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Abril 2007                 | Policlínico<br>Central               | SAN LUIS            | herida quirúrgica         | <i>aac(6')-Ib-cr7</i>                                |
| Q1130                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Abril 2007<br>Abril 2007   | Centro de<br>Microbiología<br>Médica | TUCUMAN             | orina sin sonda           | <i>qnrE1</i>                                         |
| Q1187                   | <i>E. coli</i>            | Abril 2007                 | Sanatorio<br>Mitre                   | CABA                | sangre                    | <i>aac(6')-Ib-cr5</i>                                |
| Q1211                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Abril 2007                 | Rawson                               | SAN JUAN            | piel y partes<br>blandas  | <i>qnrB2</i>                                         |
| Q2108                   | <i>K. pneumoniae</i>      | Abril 2007                 | Dr. Cosme<br>Argerich                | CABA                | orina con sonda           | <i>qnrB19</i>                                        |
| Q3039                   | <i>E. cloacae</i>         | Abril 2007                 | Dr. Juan A.<br>Fernández             | CABA                | piel y partes<br>blandas  | <i>aac(6')-Ib-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) |     |     |    |    |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|-----|-----|----|----|
| Transconjugantes con un solo plásmido |                      |                |     |     |    |    |
| 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. morganii</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 |
| 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  |
| TC-M23386 | <i>E. coli</i> J53   |     |     |     |     | 66 | <20 |
| 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.<sup>13</sup> 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.

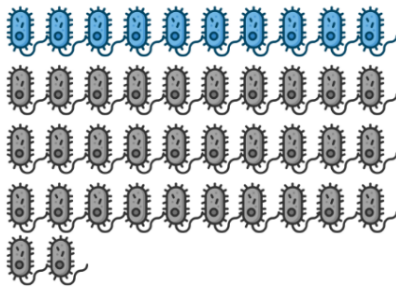
Se analizó la dispersión de tamaños de plásmidos más en detalle, y se observó que, si bien el rango de tamaños fue muy amplio, 75% de los plásmidos tiene un tamaño menor a 190 kb.

## Sección 5.04      Secuenciación masiva de ADN

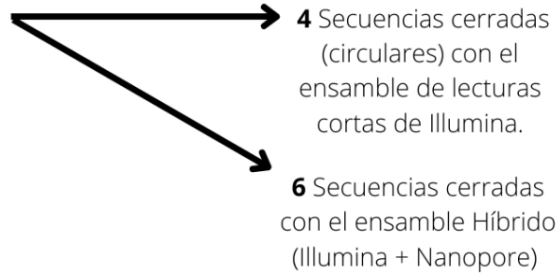
Para comenzar a caracterizar molecularmente los plásmidos incluidos en la plasmoteca (38 transconjugantes y cuatro aislamientos clínicos) se utilizaron en primera instancia las técnicas usadas rutinariamente en nuestro laboratorio, es decir extracción de ADN plasmídico con el kit indicado en Materiales 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



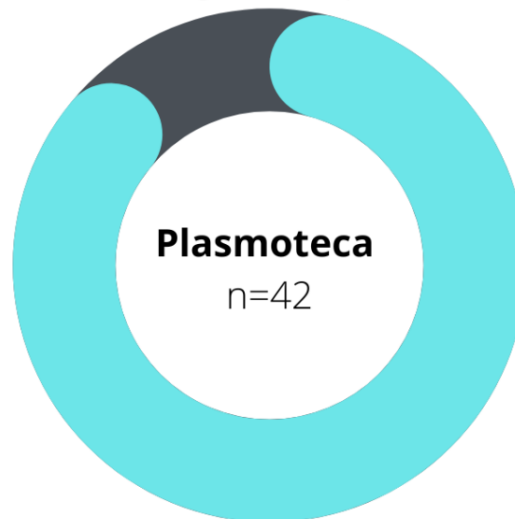
Illumina

**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<br>secuenciadas | Cobertura | Cantidad de lecturas<br>de ONT obtenidas | Lectura<br>de ONT mayor | Lectura<br>de ONT menor | Promedio del<br>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 lecturas de ONT mayor del contig de mayor tamaño, y de menor tamaño. \*Para *E. coli* J53 se utilizó el tamaño de 4.682.574 pb<sup>139</sup> sumado al estimado por endonucleasa S1 para los plásmidos, y para los aislamientos clínicos el valor de la cepa ATCC correspondiente.<sup>140</sup>

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.

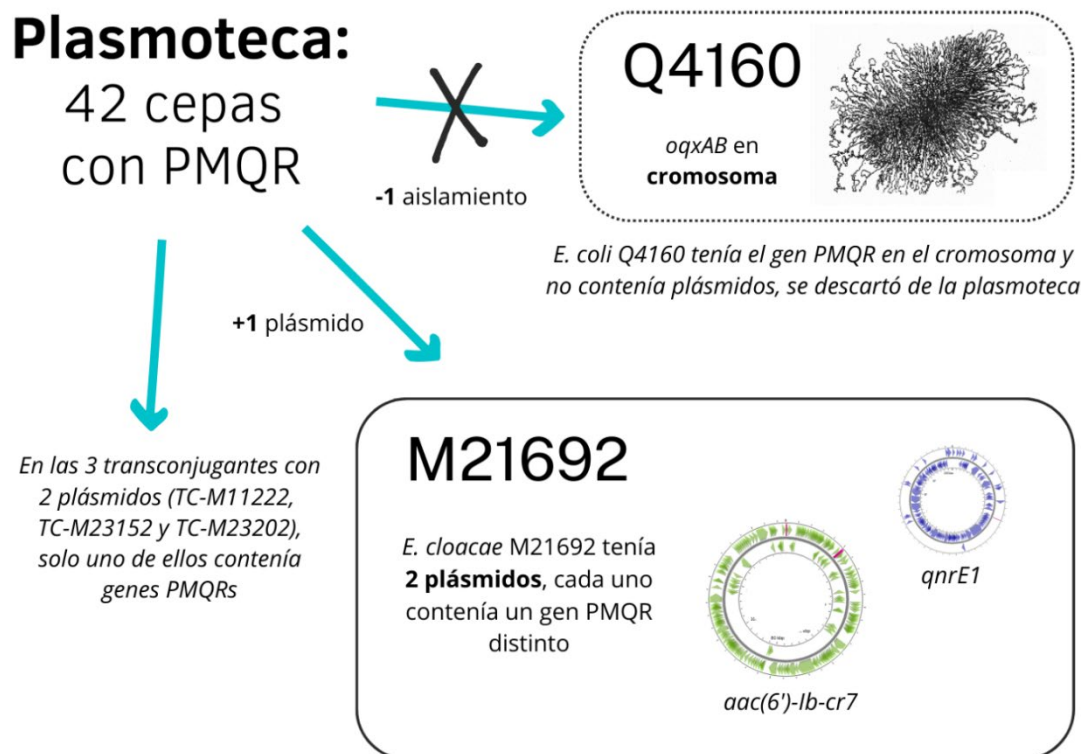
## Sección 5.05 Análisis de plásmidos portadores de genes PMQR

### (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 pKp1130<sup>36</sup>, 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 transjugantes 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                           |
|                       |                           | Se eliminó**    |          | 265                         | 274.469             | <i>qnrA1</i>                 | pEcl_M17464_274                            |
| M17464                | <i>E. cloacae</i>         | -               | Hibrido  | 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

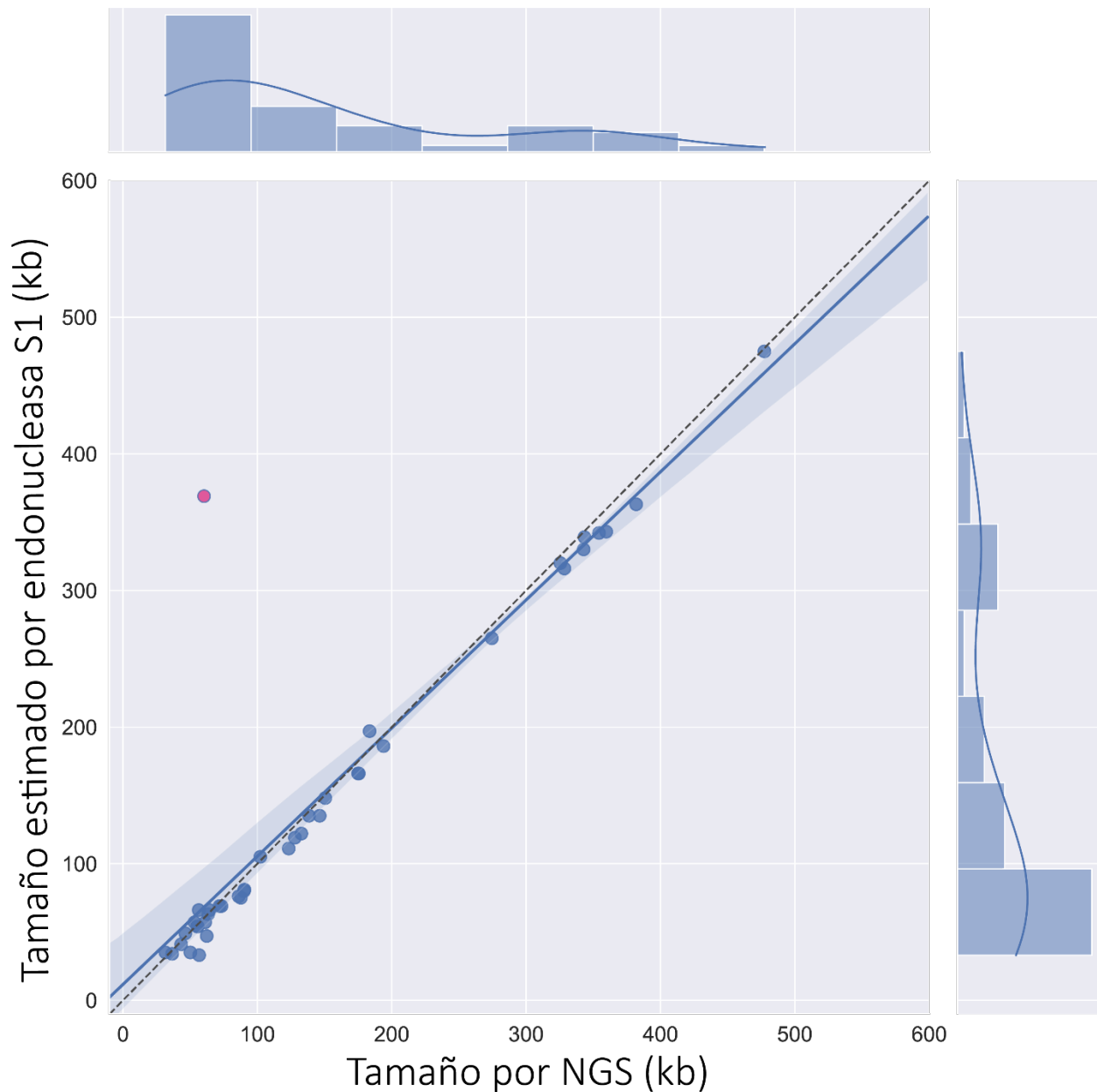
circulares de 124.864 y 36.531 pb, además del cromosoma circular. Además, en una segunda transconjugante de Q3039, denominada TC-M23126, no se habían observado bandas en el ensayo de endonucleasa S1, a pesar de haber pasado las pruebas fenotípicas y genotípicas de la conjugación [antibiograma y PCR positiva 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.<sup>141</sup> 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  $\beta$ -lactámicos. Cabe destacar la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), tipo *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub> y *bla*<sub>SHV-5</sub>. 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*.<sup>142, 143</sup> 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.

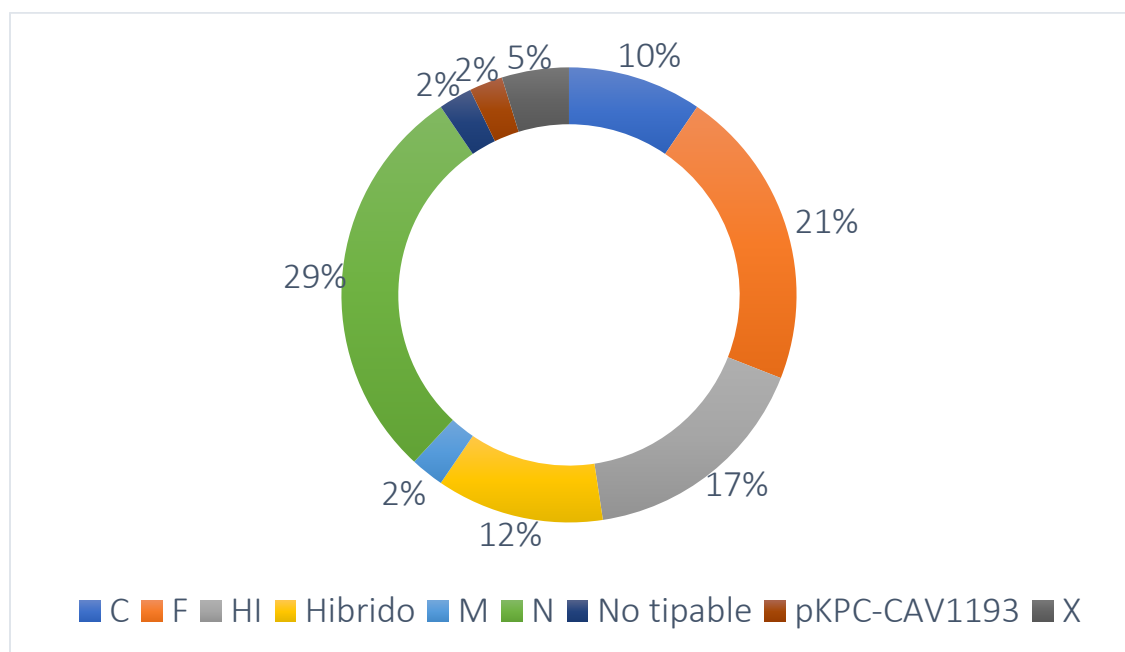
# Resultados Objetivo II - Análisis de plásmidos portadores de genes PMQR

| Nombre del plásmido       | MDR          |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
|---------------------------|--------------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|
|                           | <i>mcr-9</i> | <i>bleO</i> | <i>arr-3</i> | <i>arr</i> | <i>sul2</i> | <i>sul1</i> | <i>tet(B)</i> | <i>tet(G)</i> | <i>tet(D)</i> | <i>tet(C)</i> | <i>tet(A)</i> | Otros |
| <b>qnrA1</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECI_M17464_274           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB1</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9863_197            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M21014_175           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pPst_M22246_146           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB2</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECo_M9902_127            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pSsl_M9966_359            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q1211_174            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKox_Q4020_53             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q4016_381            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB4</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKsg_M17277_477           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB10</b>             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9314_63             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pCfr_Q4143_61             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKva_M7943_60             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pEko_M9921_354            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pSma_M9684_342            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PEL_M7916_325             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M11085_64            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PEL_Q5029_328             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9828_71             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q5099_132            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB19</b>             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECo_M9820_36             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECo_M11059_31            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q2108_343            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrB52</b>             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKsg_M17277_123           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrE1</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q1130_193            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKva_M9257_90             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M21692_102           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>qnrS1</b>              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9932_55             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9167_86             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKox_M11007_87            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>aac(6)-Ib-cr5 sola</b> |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pEae_M9518_55             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9306_90             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pMmo_M9277_46             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKox_Q3108_43             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECo_Q1187_50             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_Q3094_56             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9828_138            |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| <b>aac(6)-Ib-cr7 sola</b> |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PEL_Q3039_36              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PECo_Q4134_62             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| PEL_Q5005_56              |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M9992_73             |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |
| pKpn_M21692_150           |              |             |              |            |             |             |               |               |               |               |               |       |

**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.<sup>14, 34</sup>



**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 replicón 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.<sup>14</sup> Dos plásmidos del grupo X2 (2/42), con tamaños de 31 y 36 kb (los más pequeños de la plasmoteca), acorde a lo descripto 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 EGMs<sup>14</sup>. 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.

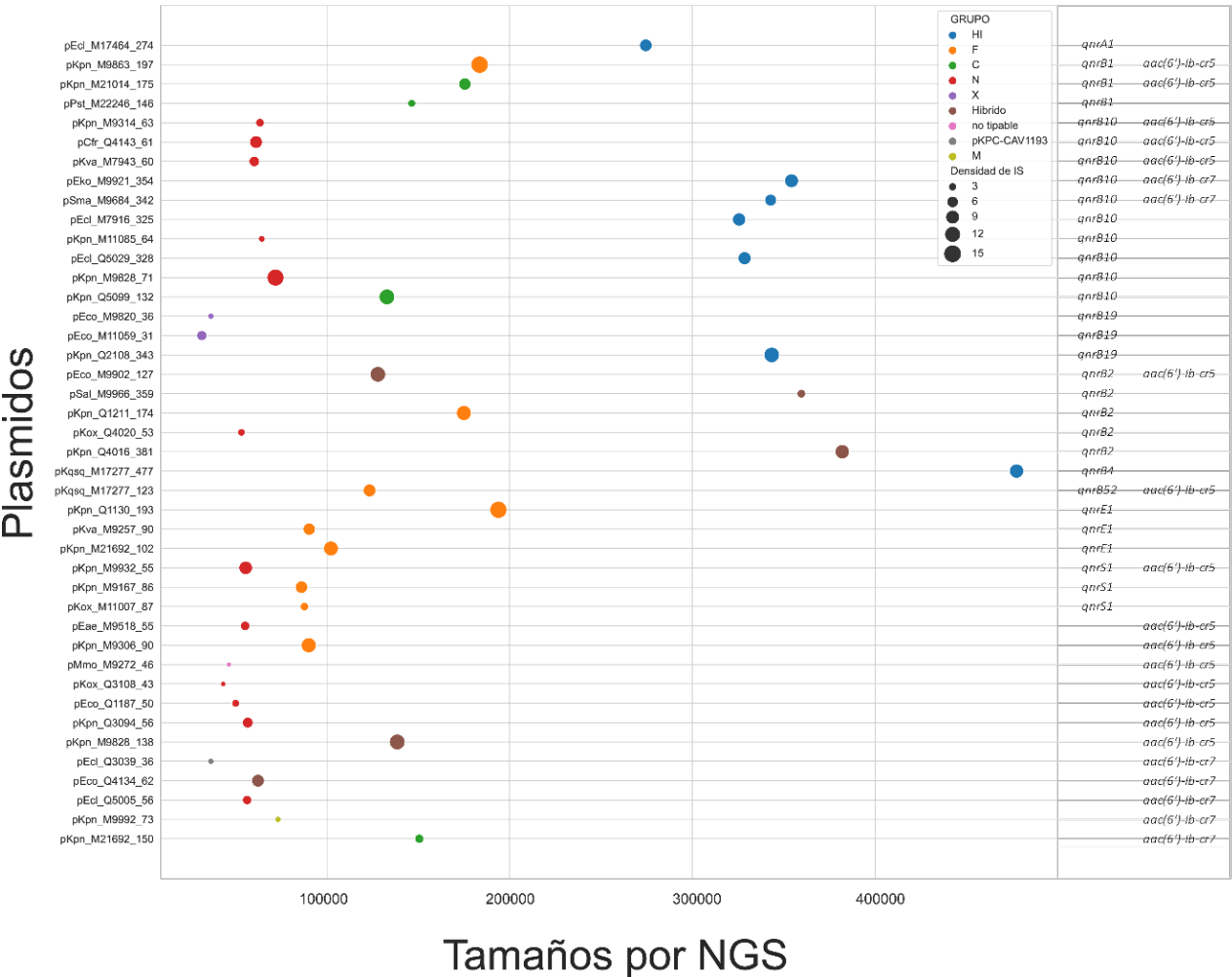
b) Dos plásmidos que contenían combinaciones con dos grupos no encontrados en forma individual en los plásmidos mencionados hasta aquí: pEco\_Q4134\_62 con los replicones N y U (62 kb), y pKpn\_M9828\_138 con FII y R (138 kb).

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

en los mismos, lo cual sugiere que un gen PMQR particular es capaz de diseminarse mediante diversos grupos de plásmidos. Si bien los 3 plásmidos portadores de *qnrE1* incluidos en esta tesis fueron del grupo F, cabe recordar que el plásmido con este mismo gen descrito en Brasil (pKp41M) era del grupo M1. <sup>100</sup>



**Figura 47. Grupos de plásmidos detectados en la plasmoteca y densidad de IS.** Los 42 plásmidos de la plasmoteca se indican en el margen izquierdo de la figura, y están ordenados de arriba a abajo, de acuerdo a los genes PMQRs que portan (indicados a la derecha). La escala horizontal indica el tamaño de los plásmidos en pb. Los colores de los círculos representan los grupos de plásmidos, los plásmidos híbridos (más de 1 replicón) y el único caso de un plásmido no tipable, de acuerdo a la base de datos de Plasmid Finder. El tamaño de los círculos indica la densidad de IS de cada plásmido (ver siguiente sección).

Con el fin de identificar los EGMs más relevantes presentes en los plásmidos, se analizó la presencia de ISs, transposones de la familia Tn3 e integrones, mediante herramientas bioinformáticas.

### (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/10<sup>5</sup> 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.

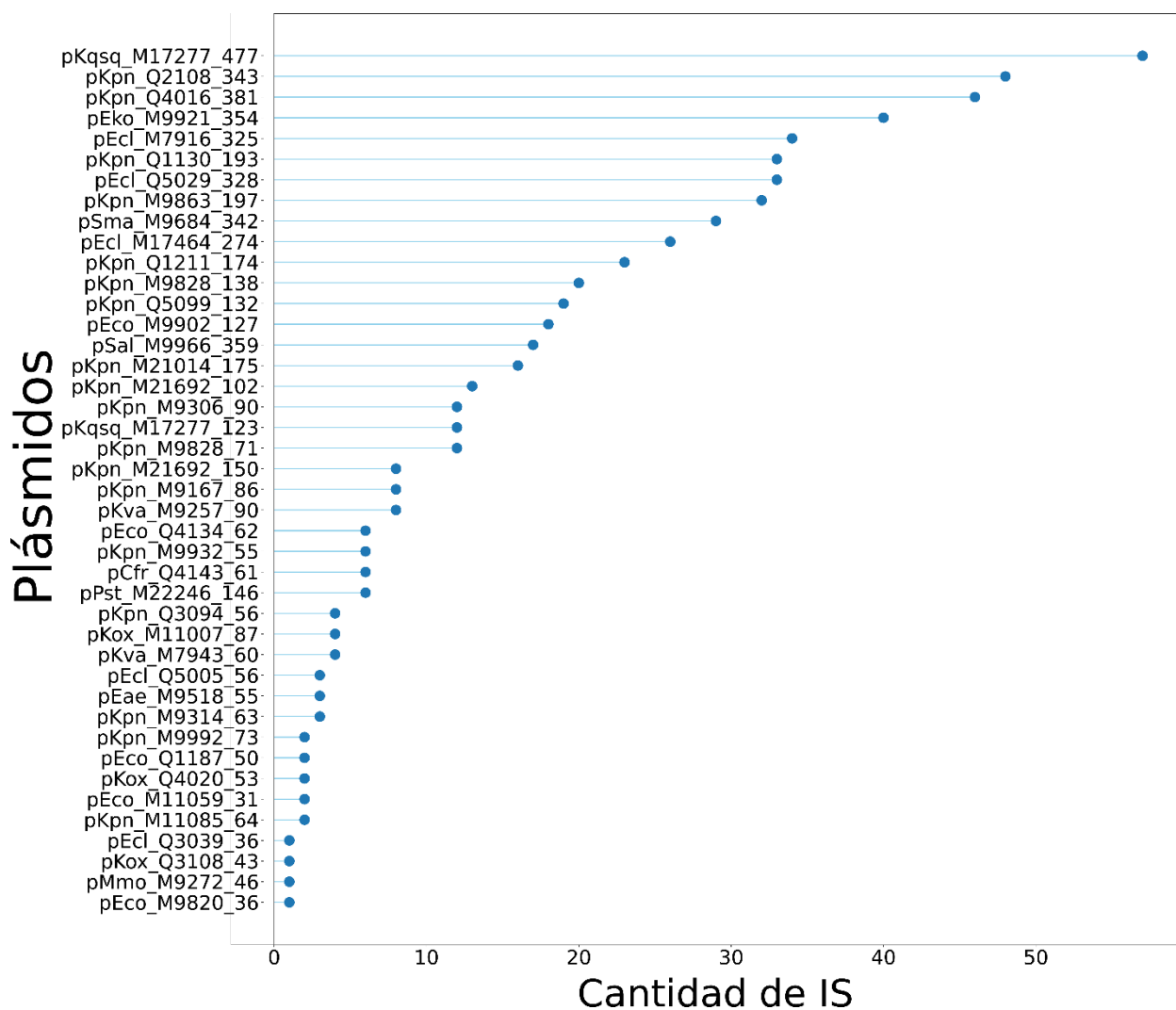
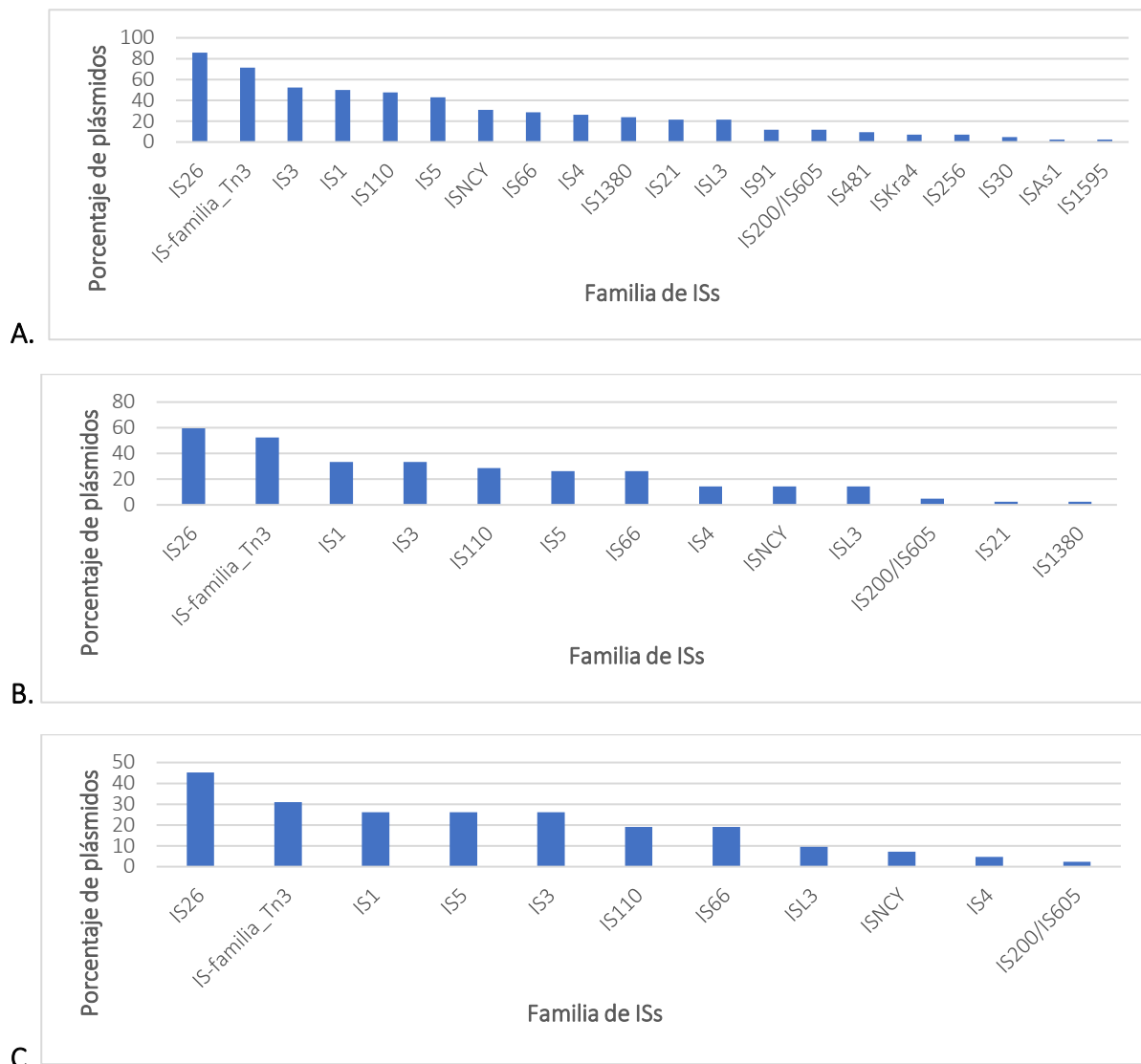


Figura 48. Cantidad de ISs encontradas en cada plásmido portador de PMQRs. El contenido de ISs varió desde 1 a 57 por plásmido.

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.

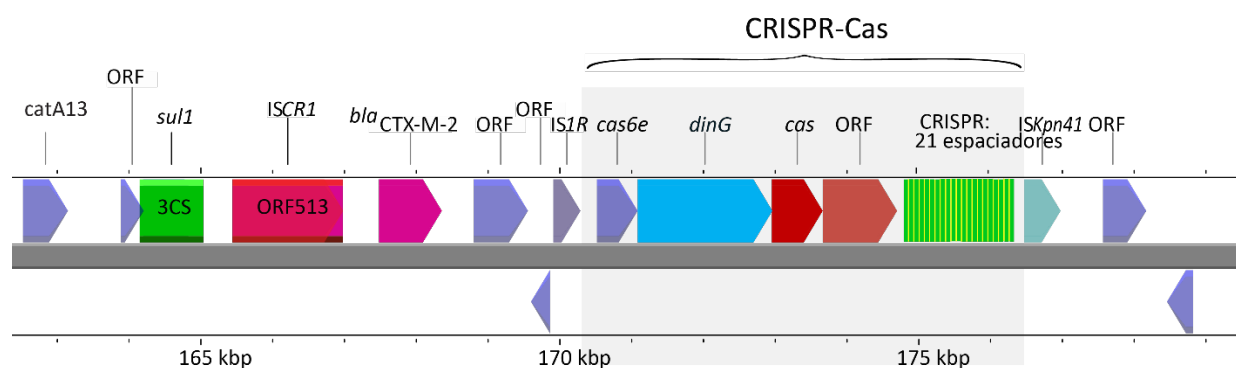
### (f) Integrones

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.<sup>29, 55</sup> 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*<sub>CTX-M2</sub> 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*

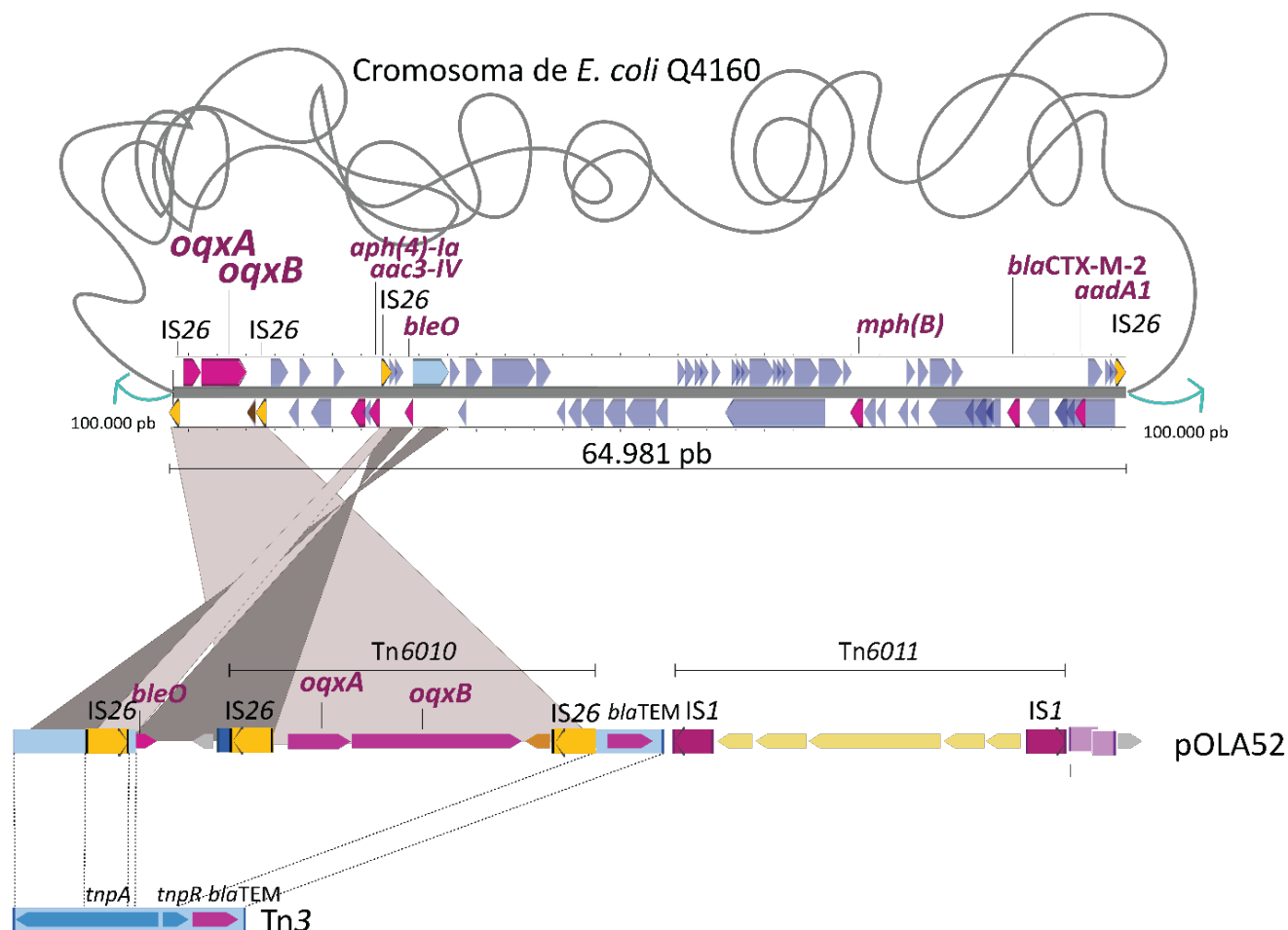
En el aislamiento *E. coli* Q4160, no se logró transferir por conjugación los determinantes genéticos que otorgan el fenotipo característico de *oqxAB*. Tampoco se observó ningún plásmido por la técnica de endonucleasa S1, a pesar de los reiterados intentos realizados. Por esta razón, se secuenció directamente 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.<sup>108</sup> 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<sub>CTX-M-2</sub>* 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*.

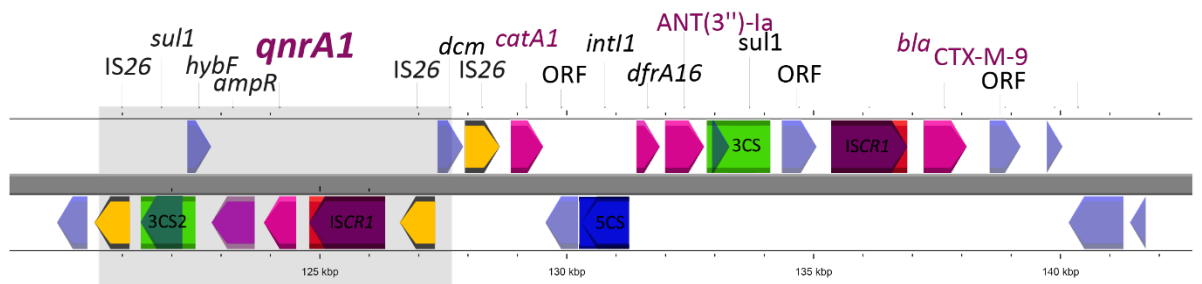


**Figura 51. Localización de *oqxAB* en el cromosoma de *E. coli* Q4160 y comparación con su localización en pOLA52.** La región del cromosoma de *E. coli* Q4160, que contiene *oqxAB* y está flanqueada por IS26 (64.981 pb) está representada en escala. Arriba y abajo de la línea gris gruesa se muestran 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 bibliografía<sup>144</sup>, 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.<sup>145</sup> 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.

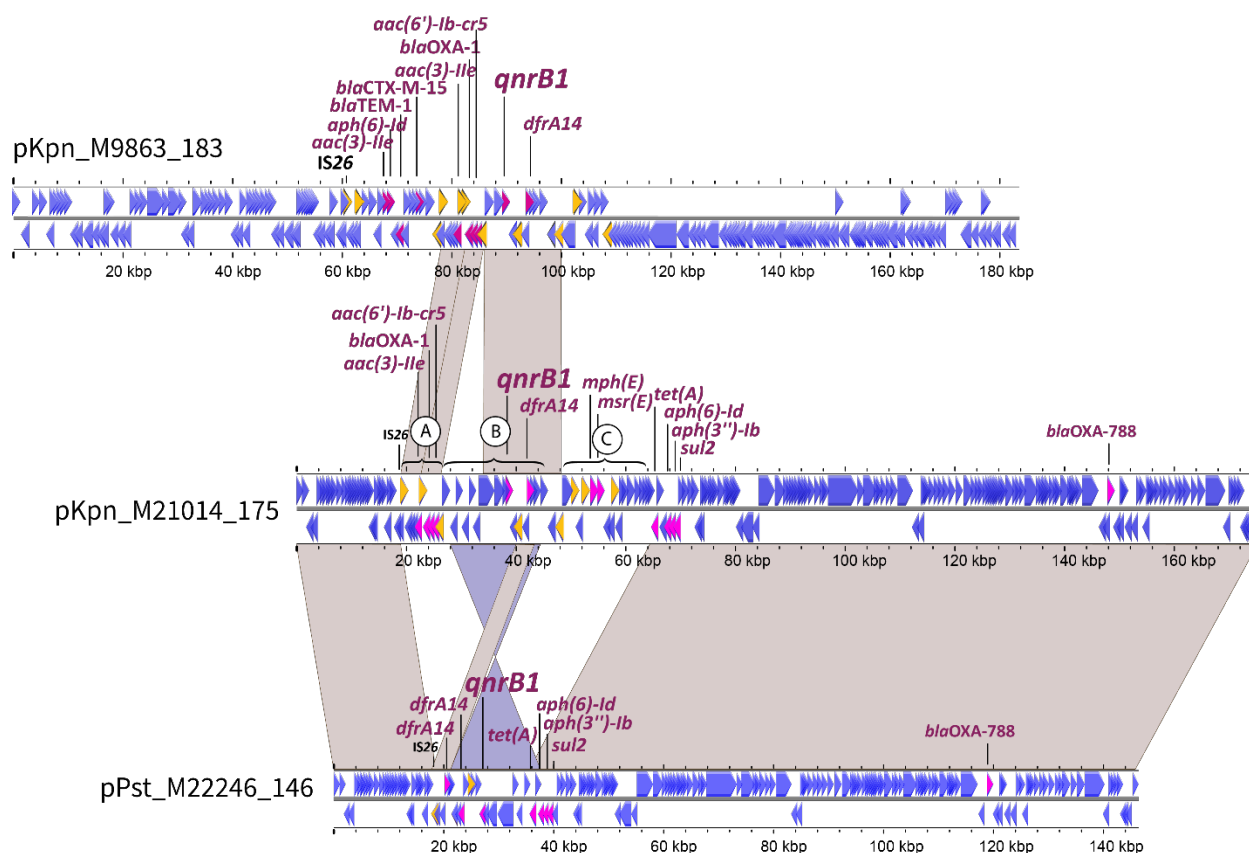


Figura 53. Alineamiento de los tres plásmidos portadores de *qnrB1*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon 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*<sub>CTX-M-15</sub> 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 descritos 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.

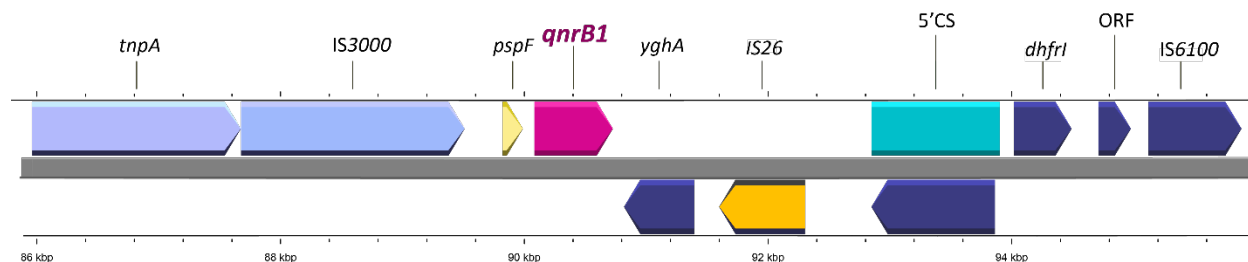


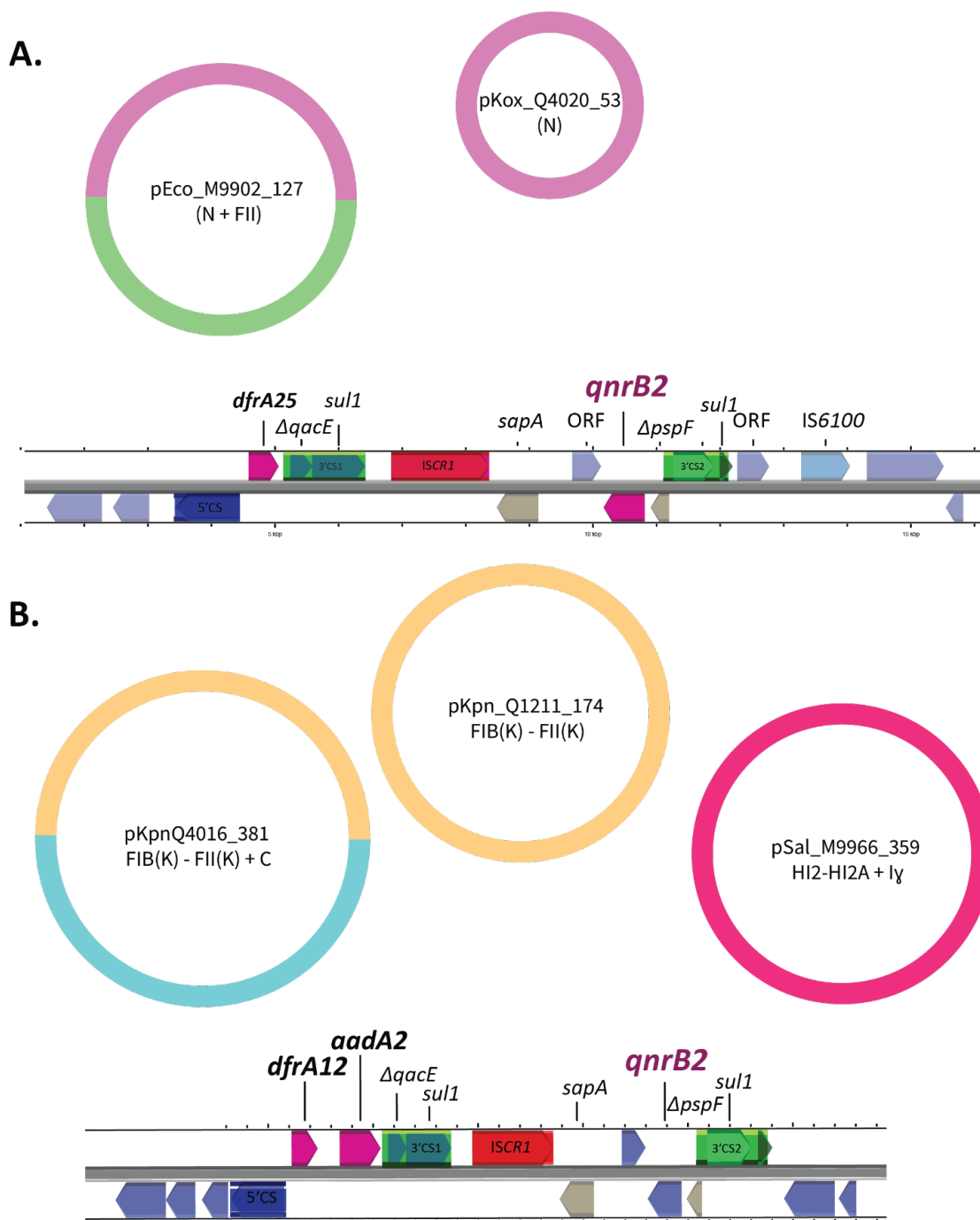
Figura 54. Entorno genético de *qnrB1* en común entre los tres plásmidos (pKpnM9863\_183, pKpnM21014\_175 y pPstM22246\_146). Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica la numeración otorgada 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 previamente<sup>146</sup>. 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<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *aac(6')-Ib-cr5*, *tet(A)* y *bla<sub>OXA-1</sub>* 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)*.

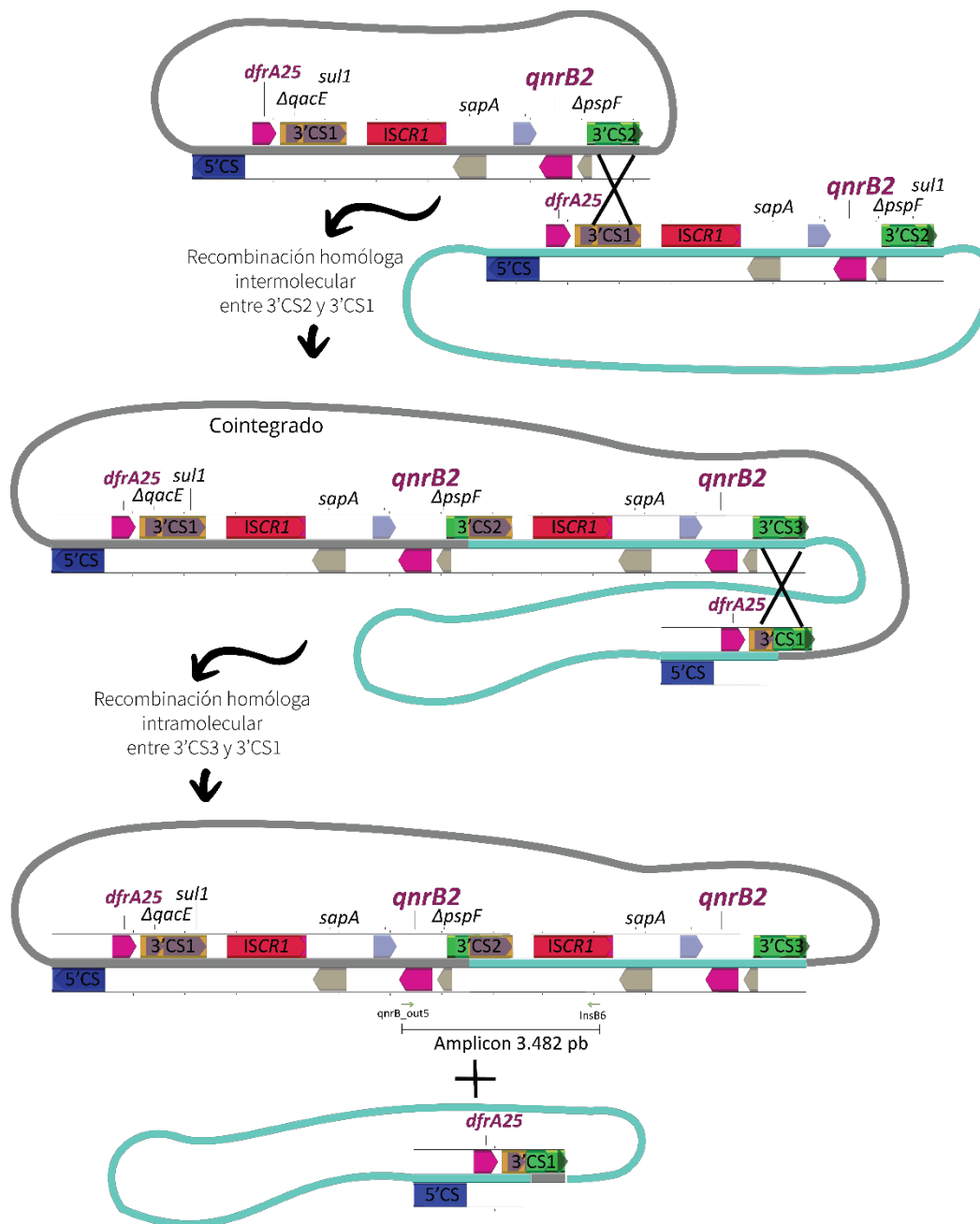


**Figura 55. Integrones portadores de *qnrB2*.** Se detallan los grupos de plásmidos A y B separados según la combinación de casetes de la *vr-1* encontrada en los integrones portadores de *qnrB2*. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa 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 *Δpsp* 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<sub>OXA-1</sub>*, *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 tandem 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 tandem 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 tandem. 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 recombinação 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 recombinação 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 recombinação 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.

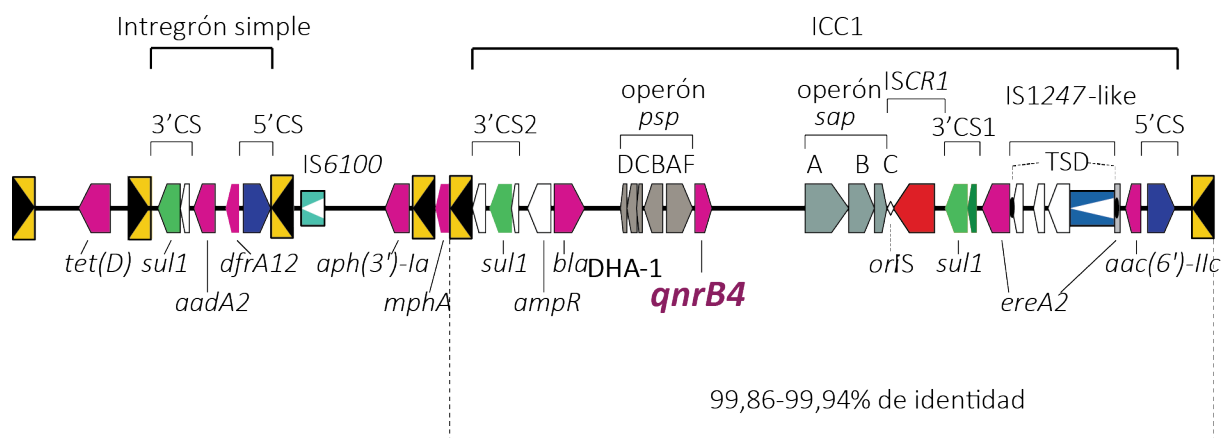
### (e) *qnrB4* y *qnrB52*

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<sub>DHA-1</sub>* 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*<sub>SHV-12</sub>, *catA2* y el gen *mcr-9* sin los genes *qseC* y *qseB* que permiten su expresión (Figura 58)<sup>143</sup>, lo cual explica la ausencia de resistencia a colistín en M17277.

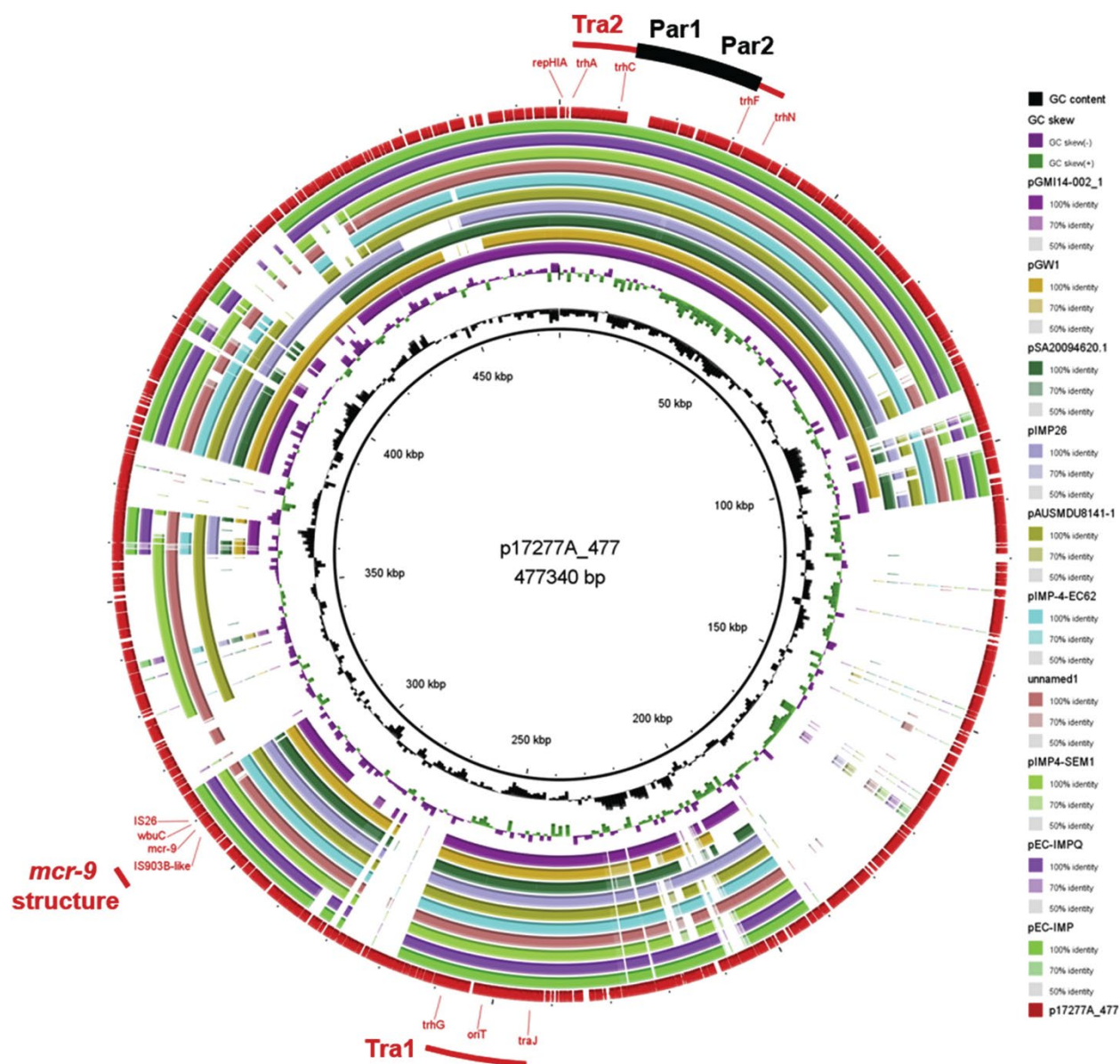
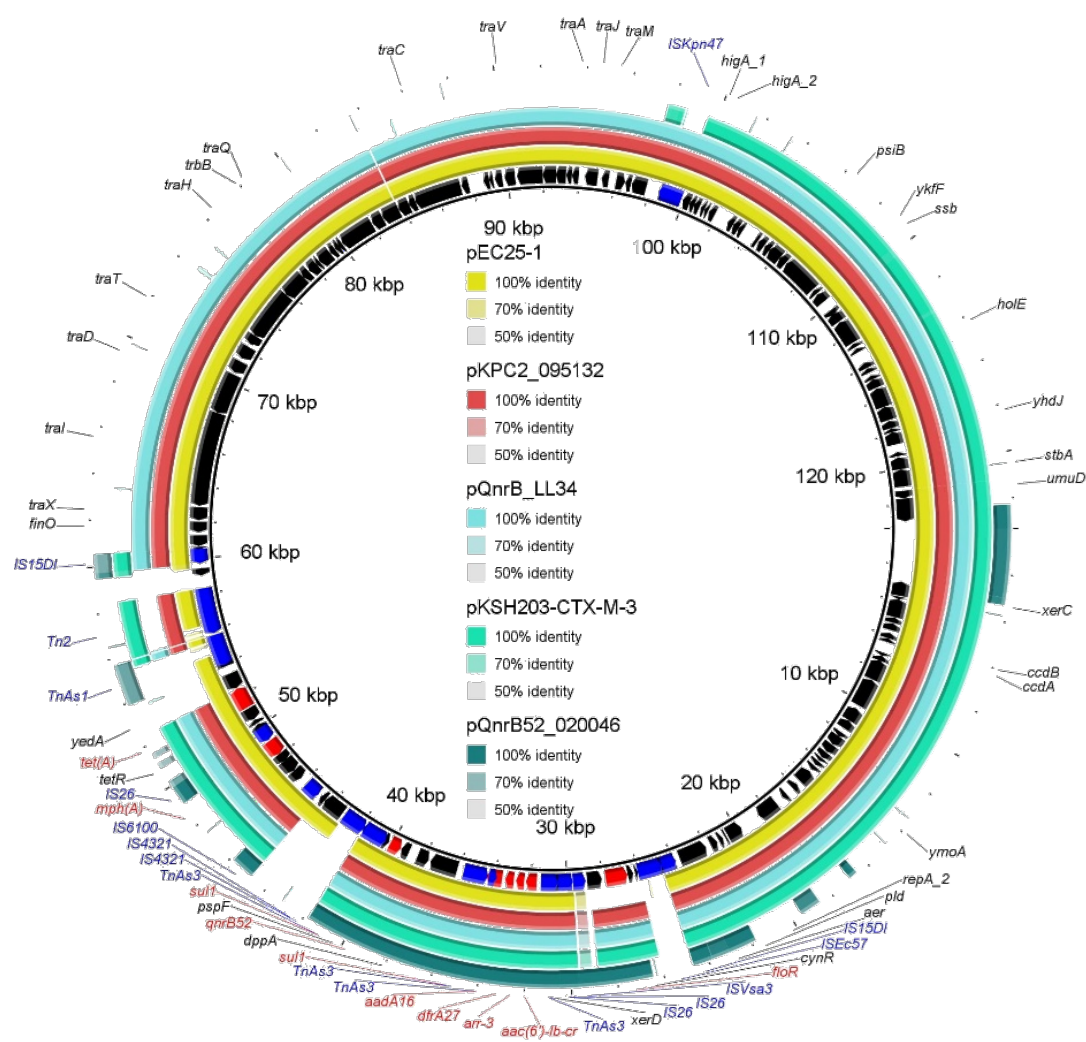


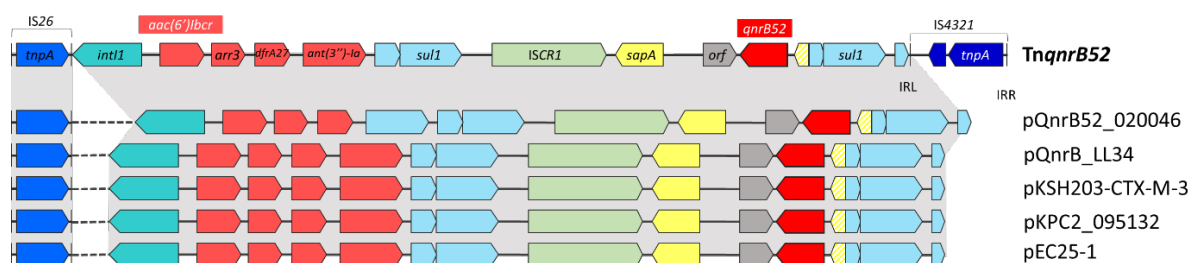
Figura 58. Comparación de pKqsq\_M17277\_477 con los diez plásmidos de NCBI-BD con mayor identidad mediante BRIG. La línea negra representa la secuencia de ADN con la numeración comenzando en la primera base del gen *repFII*. Los ORFs de pKqsq\_M17277\_477 se representan mediante flechas, en el anillo 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); pIMP4-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 *ΔpspF*. 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.

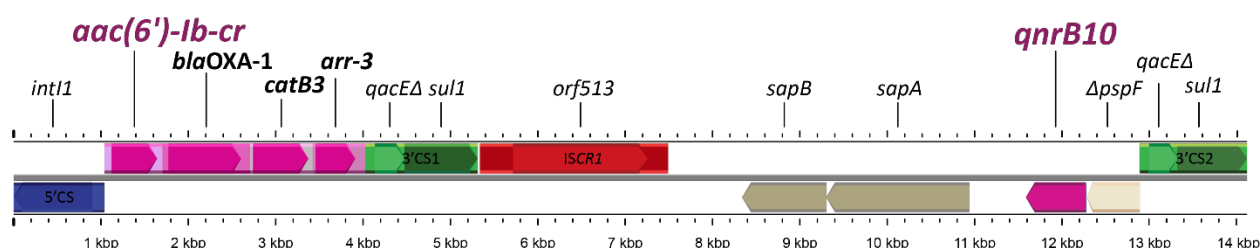
#### (f) *qnrB10*

Diez plásmidos de la plasmoteca contenían *qnrB10* sólo o combinado con distintos alelos de *aac(6')-lb-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.<sup>74, 82</sup> 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 mundo<sup>82</sup>, pero hasta la fecha no se había descrito el plásmido portador. La vr-1 de este ICC1 estaba compuesta por los casetes *aac(6')-lb-cr5*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *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  $\Delta ps p$  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*<sub>SHV-5</sub>.

Tabla 11. Plásmidos portadores de *qnrB10*.

| Plásmido       | TC        | Longitud (pb) | Integrones                      | 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.

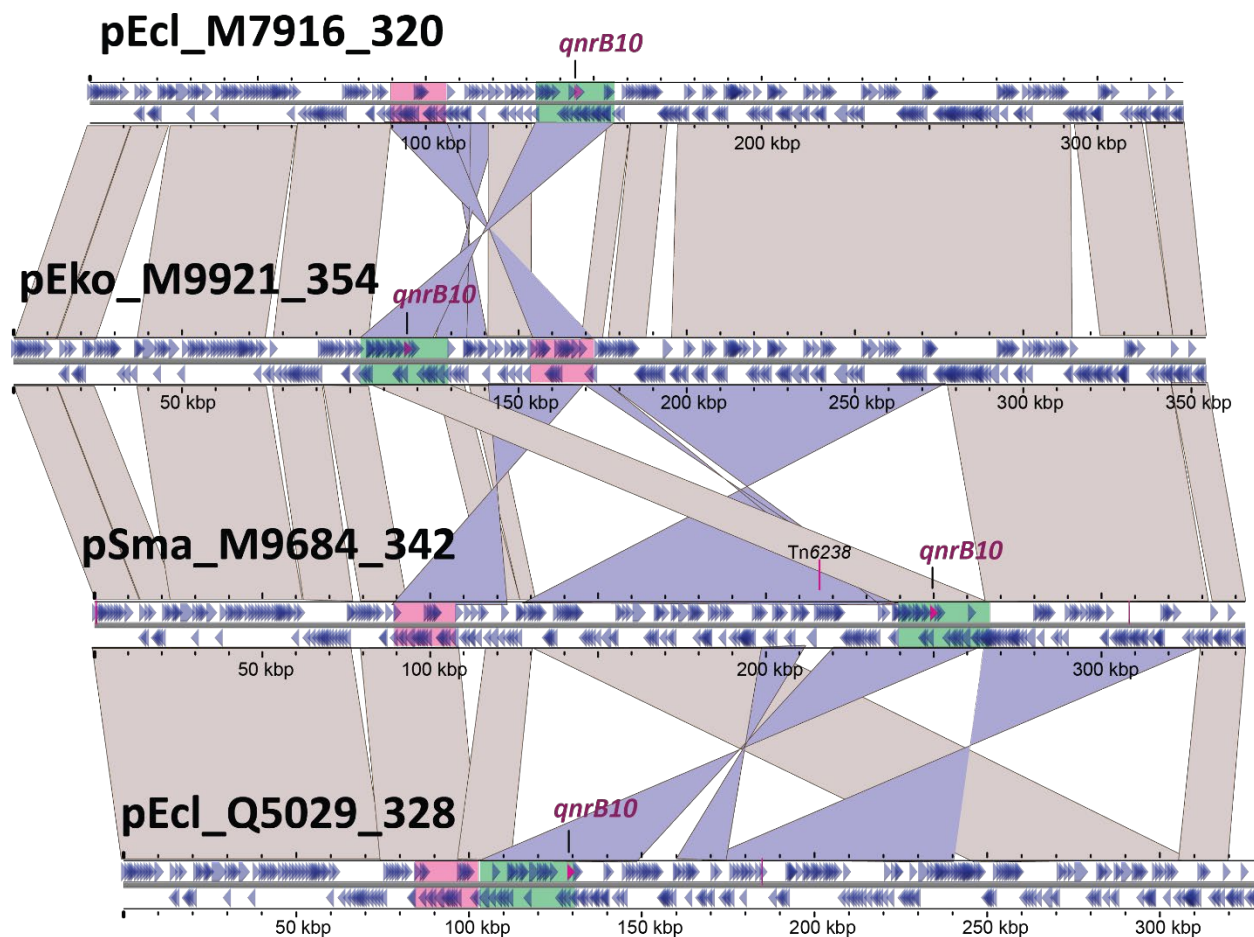


Figura 62. Comparación de los plásmidos del grupo HI portadores de *qnrB10*. Cada línea gris representa cada uno de los plásmidos que se alinearon. Por arriba y abajo de cada línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. La regla indica 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.

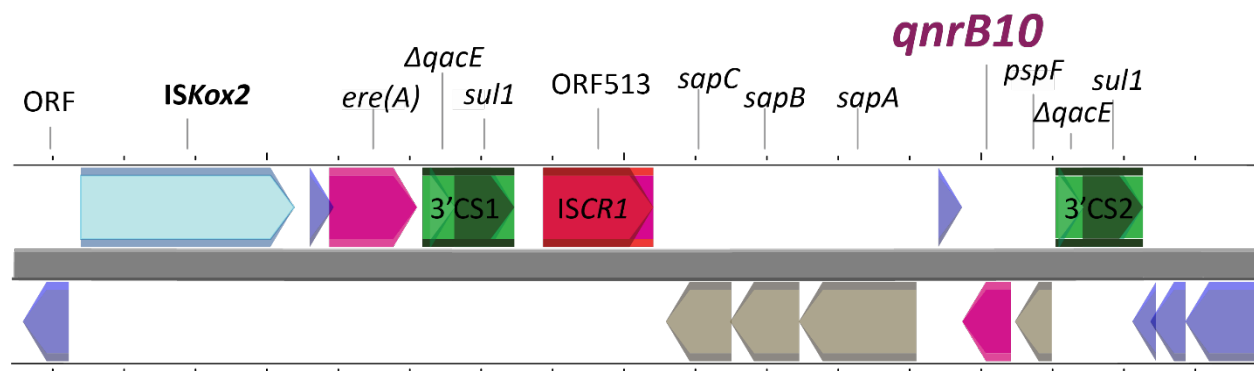
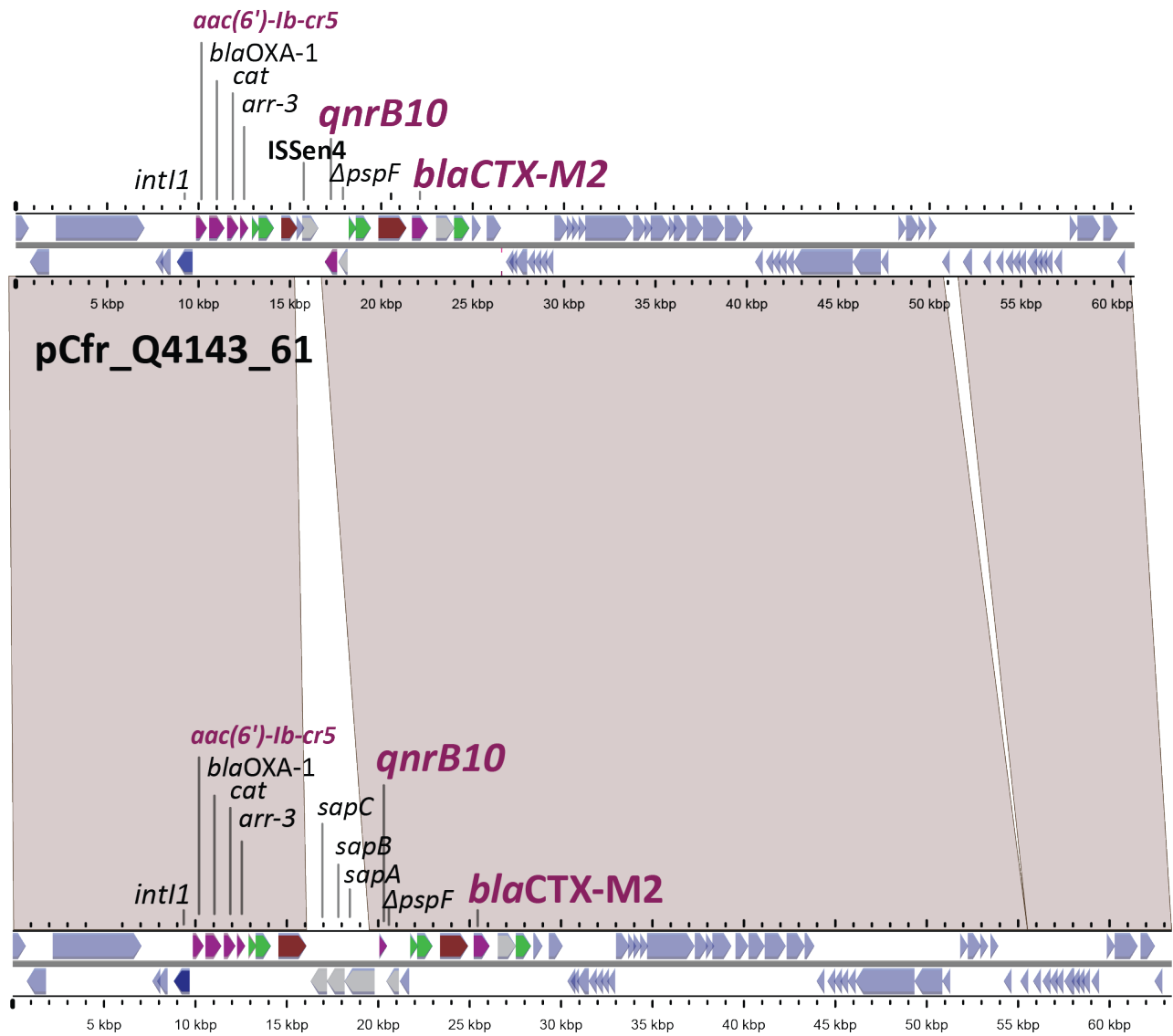


Figura 63. Región común entre los cinco plásmidos portadores de *qnrB10* en un ICC1 incompleto. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, 3'CS en verde, ISCR1 en rojo y en gris *Δpsp* 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<sub>CTX-M-2</sub>*. 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 *blaCTX-M2* 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%.

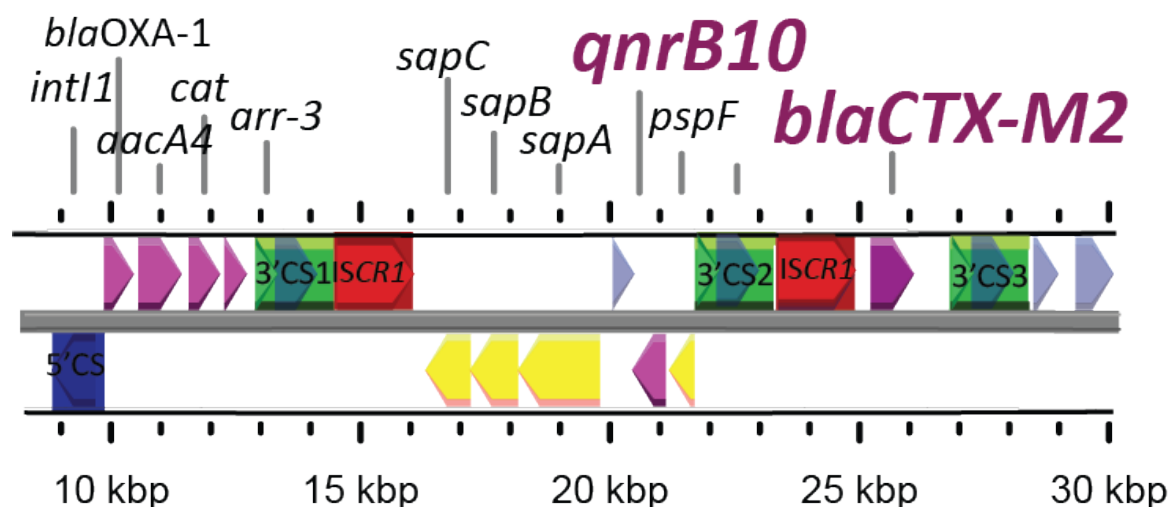


Figura 65. Integrón twin portador de *qnrB10* y *bla*<sub>CTX-M-2</sub> encontrado en pKpn\_M9314\_63. Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, el 5'CS en azul, los 3'CS en verde, ambas copias de *ISCR1* en rojo y en amarillo *Δpsp* 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.<sup>74, 83, 83, 94</sup> 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*<sub>TEM-1B</sub> (codifica para una β-lactamasa de espectro ampliado TEM-1 (Figura 66)<sup>147</sup>. 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.

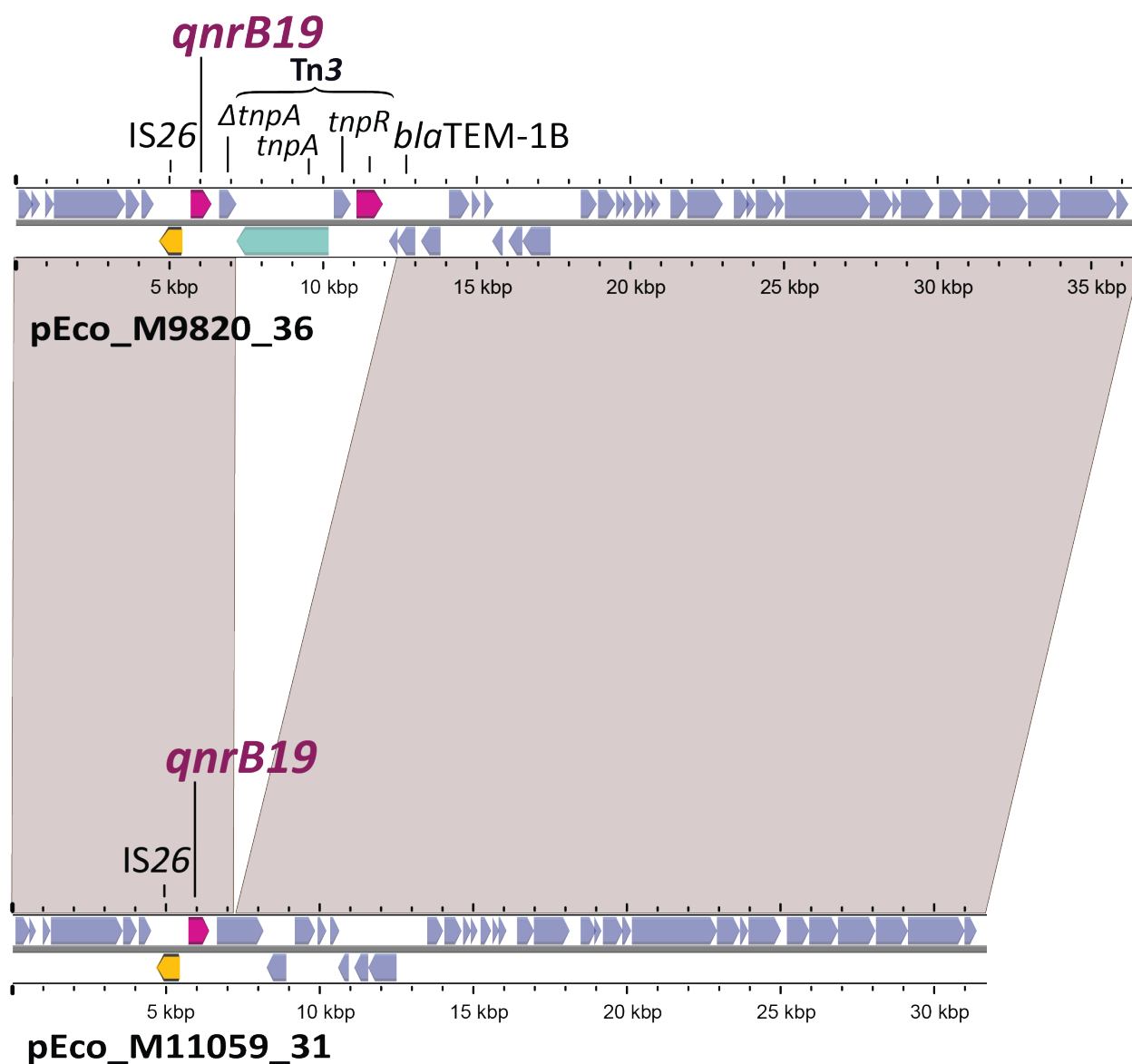


Figura 66. Comparación entre los plásmidos pEco\_M9820\_36 y pEco\_M11059\_31 portadores de *qnrB19*. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. 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.<sup>96</sup> 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.<sup>53</sup>

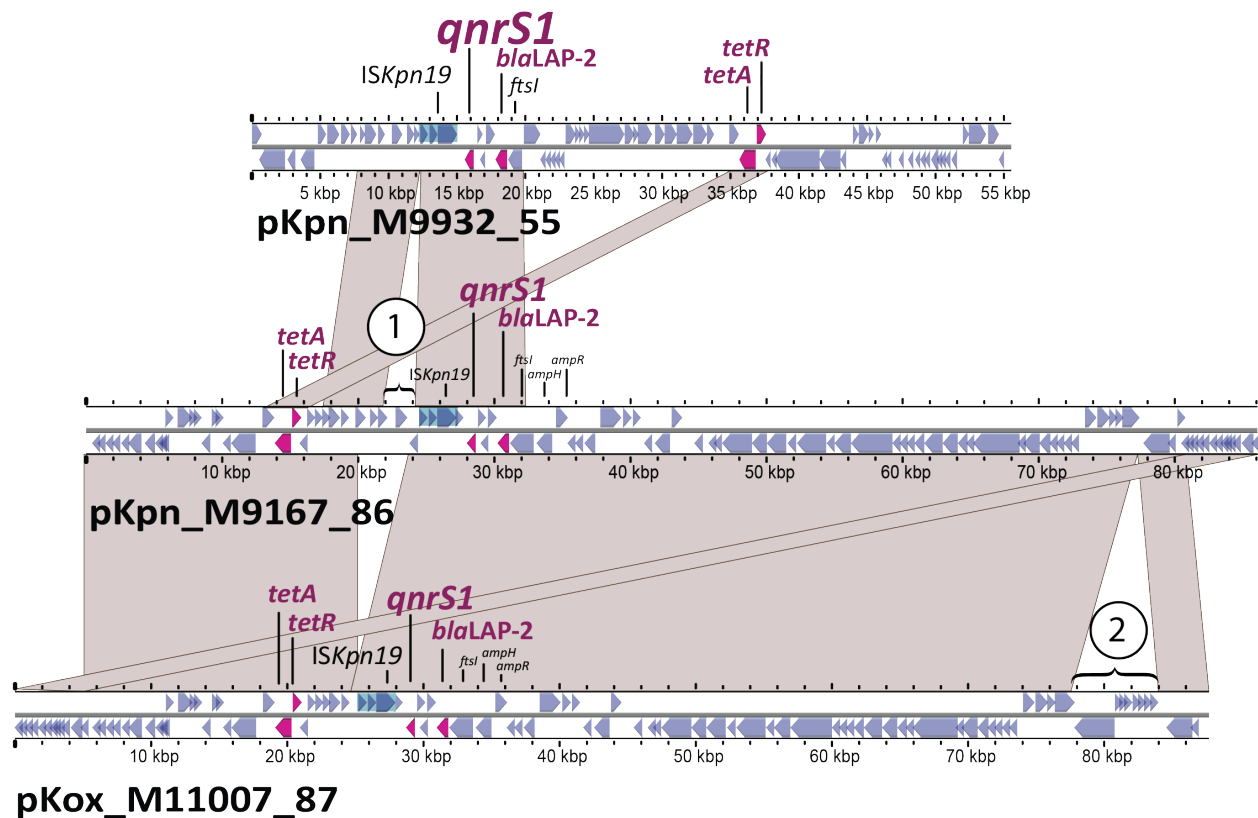
Los trabajos previos realizados por nuestro grupo<sup>74, 83, 83, 94</sup> y por otros grupos de trabajo<sup>84, 85, 86, 87, 88, 89, 90,91, 92, 93, 95, 96, 97</sup>, así como los descritos en esta tesis, en conjunto demuestran que *qnrB19* se localiza en tres entornos genéticos bien diferentes, asociado 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<sup>95, 96, 97</sup> 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<sub>LAP-2</sub>* y *dfrA1*.

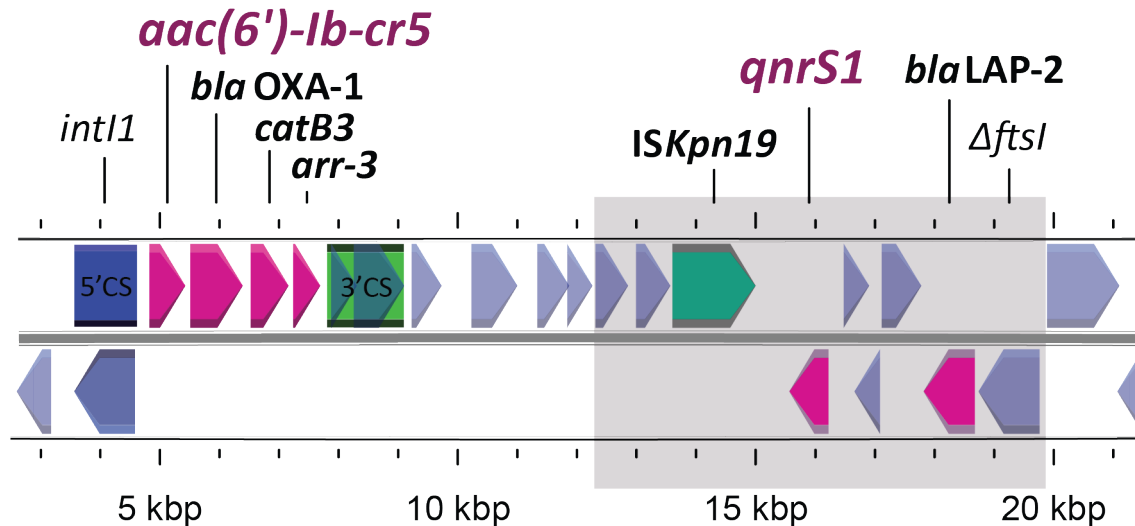
En NCBI-BD (diciembre 2022) no se encontró ningún plásmido con una cobertura mayor al 84% para pKpn\_M9167\_86, ni 77% para pKox\_M11007\_87. La principal diferencia con las secuencias encontradas en NCBI-BD se debe a la región en la que ambos plásmidos contienen el gen *qnrS1*. El entorno genético de *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  $\beta$ -lactamasa *bla*<sub>LAP-2</sub> y un fragmento del gen *ftsI*<sup>148</sup>. Ambos genes *qnrS1* y *bla*<sub>LAP-2</sub> se reportaron como parte de una probable unidad movilizable, que provendría de un mismo ancestro<sup>148, 149</sup>.



**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*<sub>LAP-2</sub> 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*<sub>LAP-2</sub>,

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<sub>OXA-1</sub>*, *catB3* y *arr-3*. Este arreglo de casetes es el mismo que se encuentra en *ln37::ISCR1::qnrB10*, uno de los ICC1 que contiene *qnrB10*.



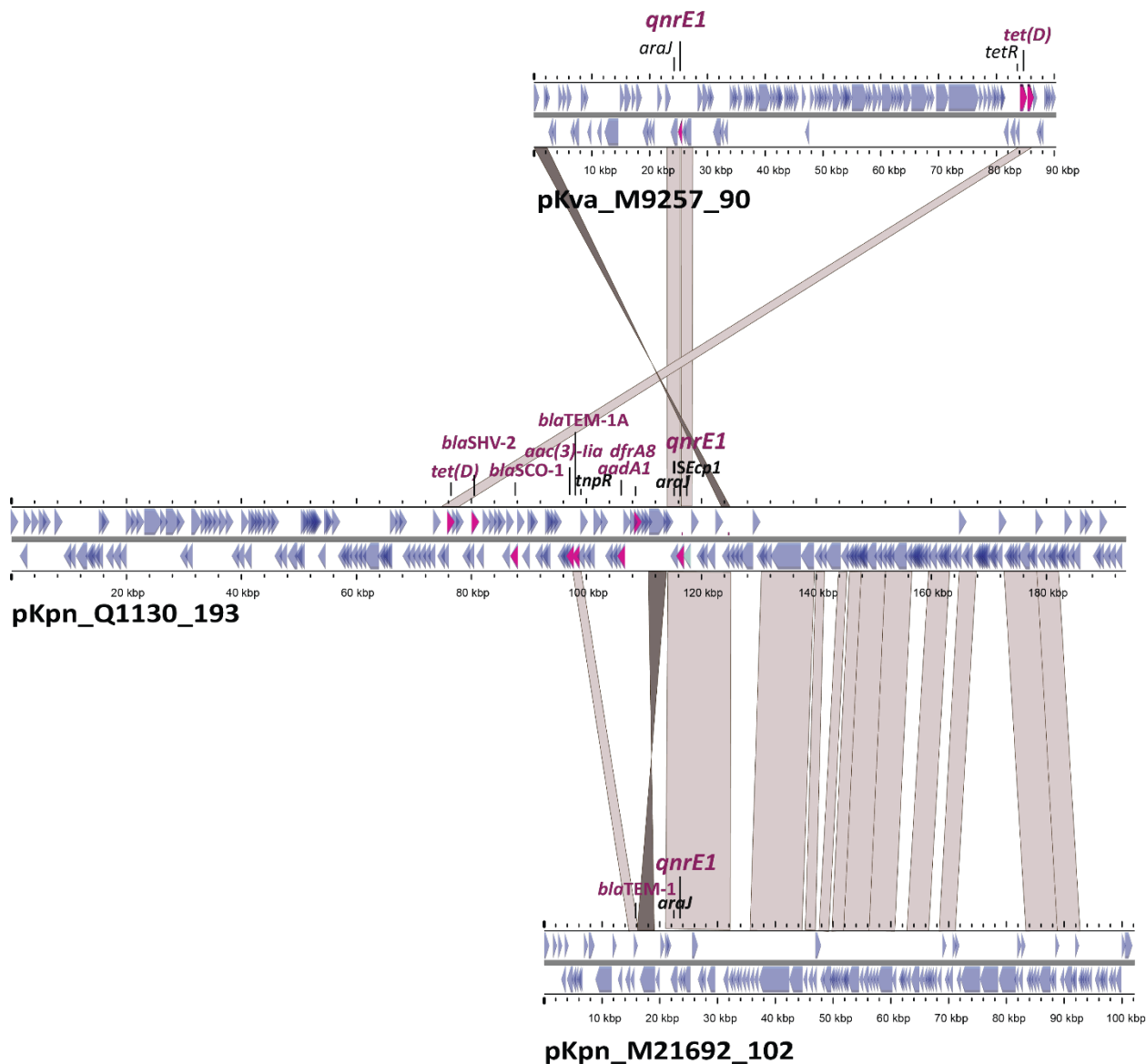
## pKpn\_M9932\_55

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*.<sup>36</sup> 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<sub>SHV-2</sub>*, *bla<sub>SCO-1</sub>*, *bla<sub>TEM-1A</sub>*, y *aac(3)-IIa* en regiones con abundantes copias de IS26. El gen *qnrE1* se encontró asociado a *ISEcp1* y a los genes *araI* 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*<sub>TEM-1B</sub>. 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.<sup>36</sup> 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.<sup>150, 151</sup> 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).<sup>100</sup>

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*.<sup>151, 152, 153</sup>

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.

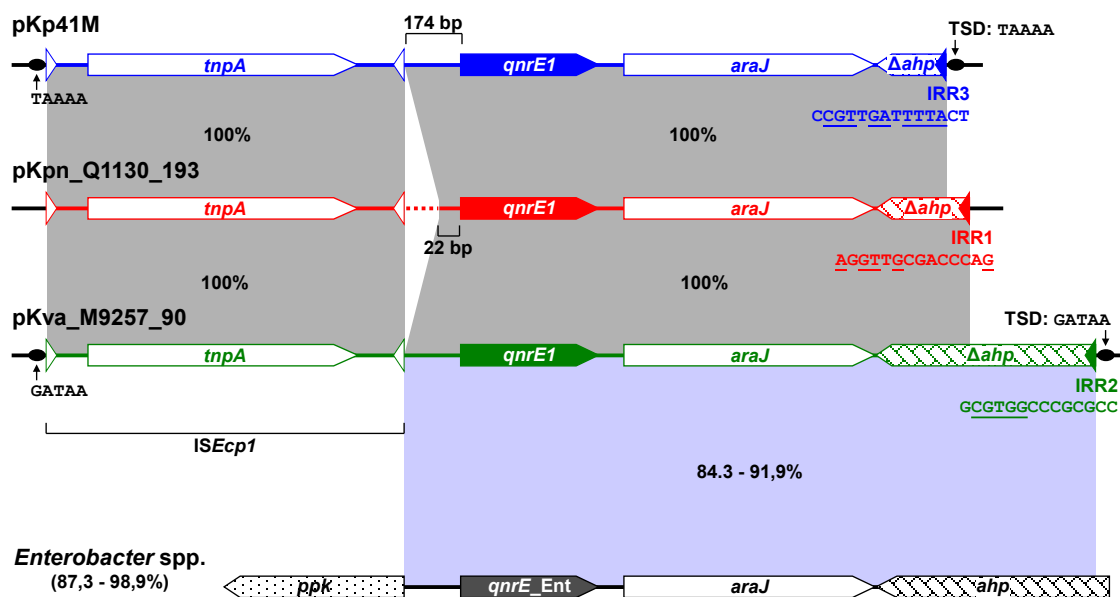


Figura 70. Comparación de los transposones derivados de *ISEcp1* que contienen *qnrE1*. En la parte superior de la figura, se representan las regiones de los plásmidos pKp41M (reportado en Brasil,<sup>100</sup> pKpn\_Q1130\_193 y pKva\_M9257\_90 (incluidos en esta tesis) que contienen transposones derivados 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.<sup>104</sup> 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 gen<sup>74</sup>: 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-cr<sup>7</sup>. 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/10<sup>5</sup> 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/10<sup>5</sup> 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. morganii*. 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/10<sup>5</sup> 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</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-2</i> , <i>arr-3</i>                                                        |
| pKpn_Q3094_56    | TC-M23384 | 56682         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | ICC1                | N                   | <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-2</i> , <i>arr-3</i>                                                        |
| pKva_M7943_60    | TC-M23825 | 60263         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | ICC1                | N                   | <i>qnrB10</i> , <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>arr-3</i>                                                            |
| pKqsq_M17277_123 | TC-M25207 | 123307        | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | ICC1                | F                   | <i>qnrB52</i> , <i>floR</i> , <i>aadA16</i> , <i>dfrA27</i> , <i>tet(A)</i> , <i>arr-3</i> , <i>mph(A)</i> , <i>bleO</i> |
| pKpn_M9314_63    | TC-M23667 | 63400         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Integron twin       | N                   | <i>qnrB10</i> , <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-2</i> , <i>arr-3</i> , <i>dfrA8</i> , <i>ere(A)</i>         |
| pCfr_Q4143_61    | TC-M11222 | 61205         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Integron twin       | N                   | <i>qnrB10</i> , <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-2</i> , <i>arr-3</i>                                        |
| pKpn_M9932_55    | TC-M23090 | 55550         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Integron Simple     | N                   | <i>qnrS1</i> , <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaLAP-2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>arr-3</i>                           |
| pKox_Q3108_43    | TC-M23097 | 43268         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Integron Simple     | N3                  | <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>arr-3</i>                                                                            |
| pEco_Q1187_50    | TC-M23337 | 50078         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Integron Simple     | N                   | <i>catB3</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>arr-3</i>                                                            |
| pEco_M9902_127   | TC-M9979  | 127921        | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Flanqueado por IS26 | N - FII             | <i>qnrB2</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>dfrA25</i> , <i>tet(A)</i>                   |
| pKpn_M9306_90    | TC-M23172 | 90069         | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Flanqueado por IS26 | F                   | <i>blaOXA-1</i> , <i>blaCTX-M-15</i> , <i>aac(3)-IIE</i> , <i>tet(A)</i>                                                 |
| pKpn_M9863_197   | TC-M23404 | 183544        | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Flanqueado por IS26 | F                   | <i>qnrB1</i> , <i>catB3</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaOXA-1</i> ,                                                       |

## 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, blaPER-2, aac(6')-Ib', 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, blaPER-2, aac(6')-Ib', aadA1, dfrA8, ere(A) floR, blaTEM-1A, blaOXA-9.1, blaOXA-101, aac(6')-Ib3, aadA1, tet(G), rmtD2</i>                                                                                                    |
| pEko_M9921_354  | TC-M23665 | 354216 | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238              | HI           | <i>floR, blaTEM-1B, blaOXA-163, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, tet(A), msr(E), mph(E) blaTEM-1A, blaOXA-9, aadA1, dfrA25</i>                                                                                                                                                                           |
| pMmo_M9272_46   | TC-M23153 | 46408  | <i>aac(6')-Ib-cr5</i> | Tn6238              | No tipable   | <i>catA1, blaOXA-9, blaPER-2, aadA1</i>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| pSma_M9684_342  | TC-M23252 | 342804 | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238              | HI           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| pEcl_Q3039_36   | TC-M23125 | 36531  | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238              | pKPC-CAV1193 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| pKpn_M21692_150 | -         | 150550 | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238-like         | C            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| pEcl_Q5005_56   | TC-M23386 | 56338  | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238-like         | N            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| pKpn_M9992_73   | TC-M23408 | 73281  | <i>aac(6')-Ib-cr7</i> | Tn6238-like         | M            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

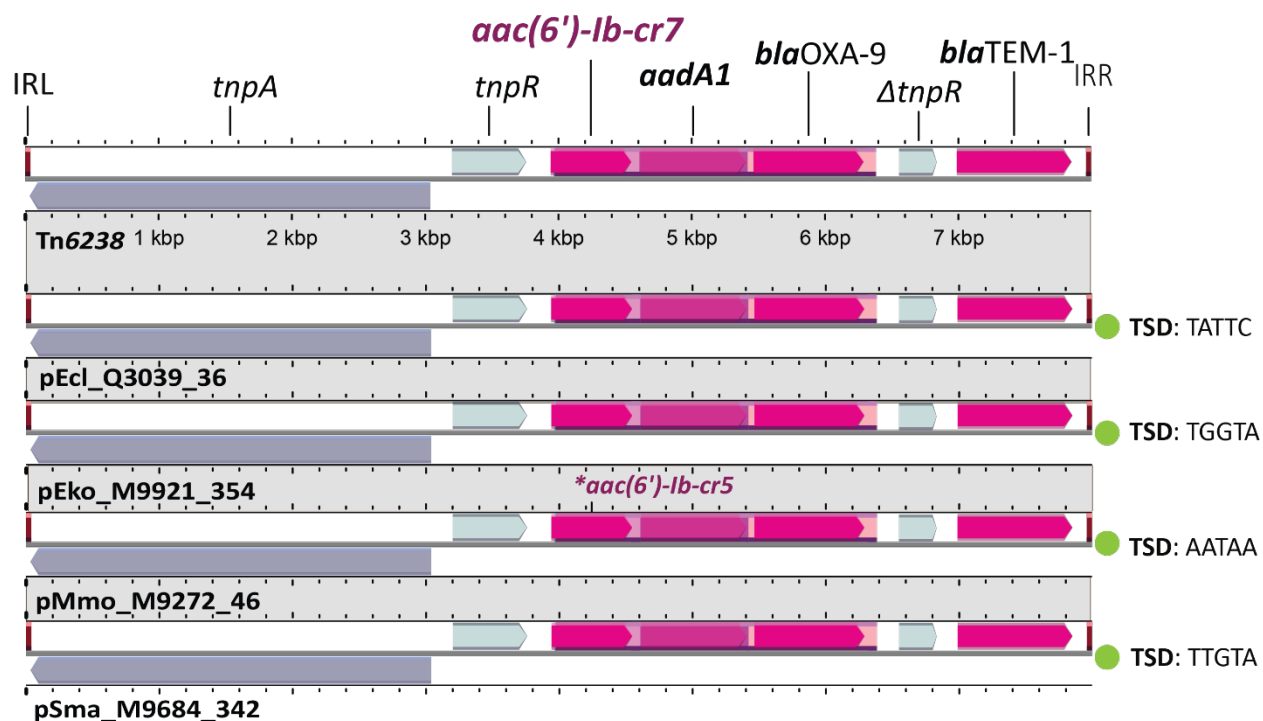


Figura 71. Tn6238 encontrados en los diferentes plásmidos. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los Tn6238, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. En barras grises entre las secuencias se 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')-lb-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')-lb-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.

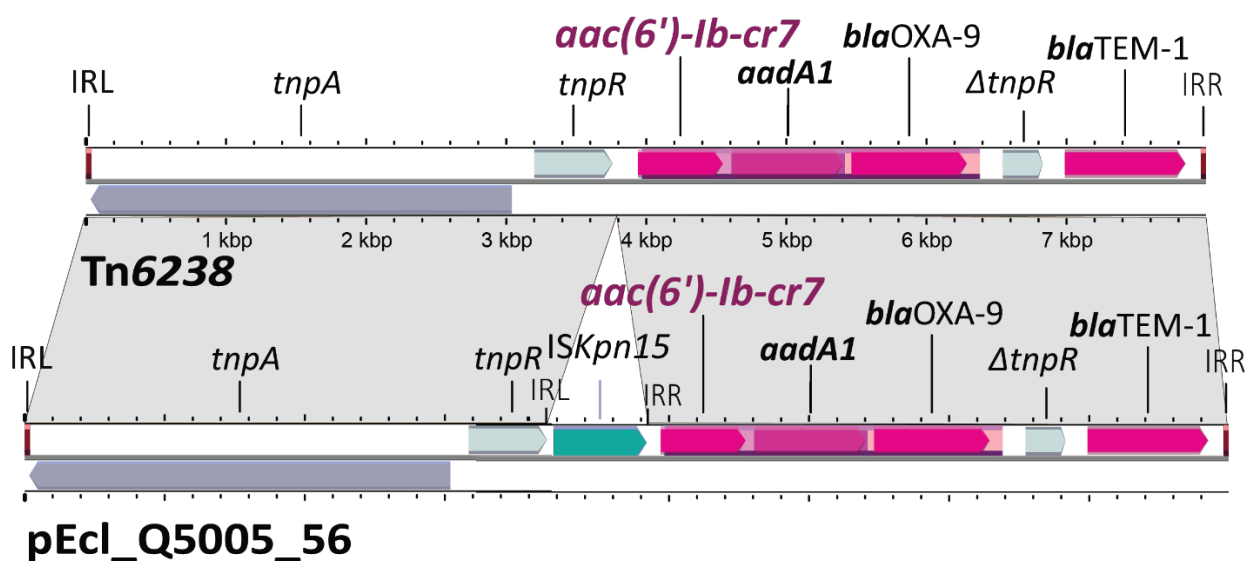


Figura 72. Alineamiento de pEcl\_Q5005\_56 con Tn6238. Las líneas grises se representan la secuencia del Tn6238 y se compara con la del pEcl\_Q5005\_56. Por arriba y debajo de las líneas grises se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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.

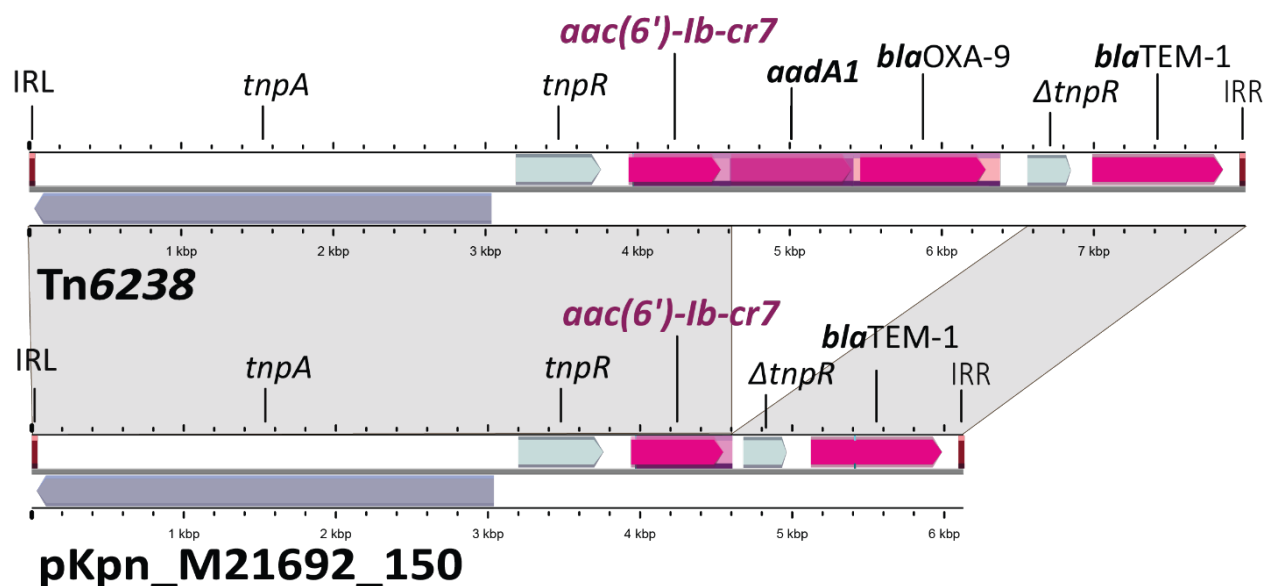


Figura 73. Alineamiento de Tn6238 con pKpn\_M21692\_150. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de los Tn6238. Por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. En barras se resaltan las regiones con una identidad mayor al 98% con orientación directa. Los genes de RAM se colorearon en magenta. En pKpn\_M21692\_150 el Tn6238 se encontró con una delección de los casetes *aadA1* y *blaOXA-9*.

El segundo plásmido con  $\Delta$ 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/10<sup>5</sup> pb. Dentro del  $\Delta$ Tn6238 se insertó un transposón compuesto que no fue descrito previamente y que contenía *bla*<sub>PER-2</sub> flanqueada por dos copias de *ISPa12* con su TSD. Además, este  $\Delta$ Tn6238 tuvo una delección de 1.096 pb, que correspondió a *bla*<sub>TEM-1A</sub> y al IRR (Figura 74).

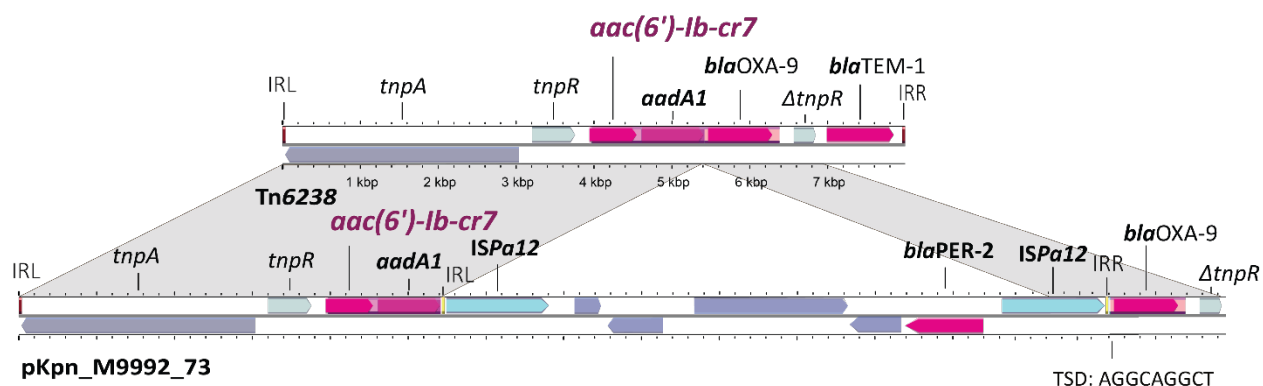


Figura 74. Alineamiento del Tn6238 con pKpn\_M9992\_73. Las líneas grises gruesas representan las secuencias del Tn6238, por arriba y abajo se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta. En barras grises se representan 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*<sub>PER-2</sub> flanqueada por dos copias de *ISPa12* con su TSD y con una delección de 1.096 pb, que correspondió a *bla*<sub>TEM-1A</sub> y al IRR.

Por último, el tercer plásmido con  $\Delta$ 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  $\Delta$ Tn6238, que tenía una delección de 2.465 pb que incluyó al *bla<sub>OXA-9</sub>*, *tnpR*, *bla<sub>TEM-1</sub>* e IRR. Además, el *tnpA* del  $\Delta$ Tn6238 se encontró interrumpido por *ISKpn9* con su TSD. Adyacente a la delección 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).

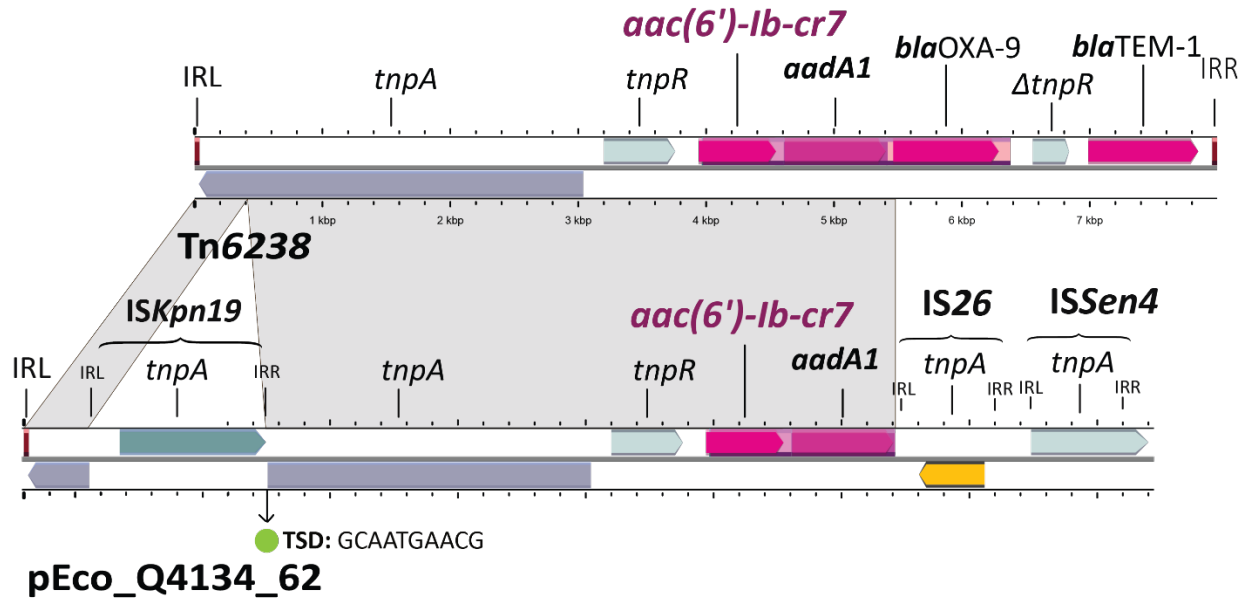


Figura 75. Alineamiento de Tn6238 con pEco\_Q4134\_62. Las líneas grises gruesas representan las secuencias del Tn6238, por arriba y abajo se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes de RAM se colorearon en magenta, la IS26 en color amarillo. 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 delección de los genes *bla<sub>OXA-9</sub>* y *bla<sub>TEM-1</sub>* posiblemente debido a rearrreglos mediados por IS26 y/o ISSen4.

Los ocho plásmidos con Tn6238/ $\Delta$ Tn6238 se aislaron de seis especies de Enterobacterales (*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/ $\Delta$ 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<sub>OXA-1</sub>*, *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')-lb-cr5*, *arr-3*, *dfrA27* y *aadA16*. De los nueve casos, tres correspondieron a ICC1, cuatro a ICC1 y dos a integrones twin.

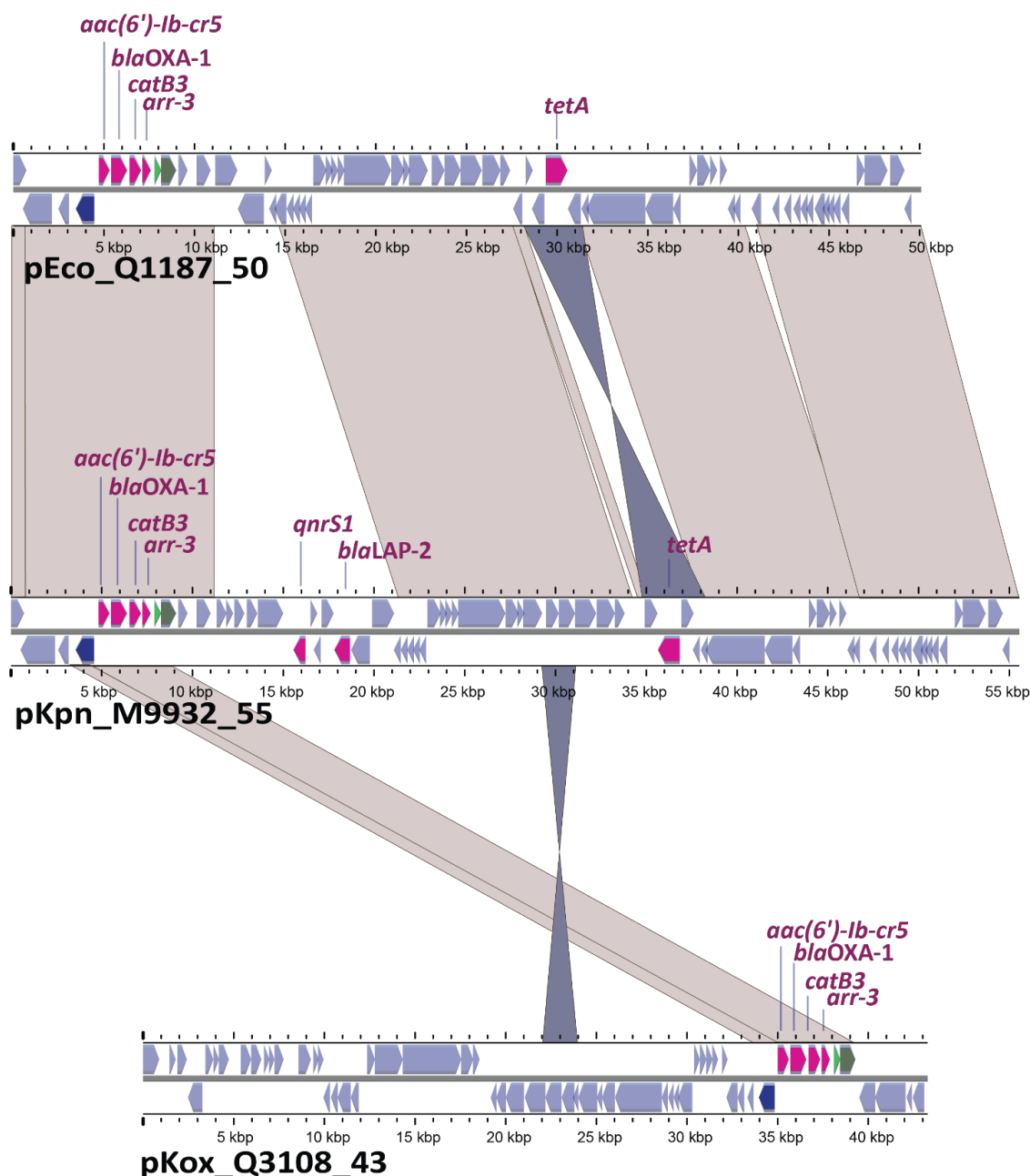
Los tres plásmidos con genes *aac(6')-lb-cr5* en ICC1s fueron: pKpn\_M9932\_55, pEco\_Q1187\_50 y pKox\_Q3108\_43. Los dos primeros plásmidos pertenecieron al grupo N y el tercero al subgrupo N3. El plásmido pKpn\_M9932\_55 también contenía *qnrS1* pero asociado a la estructura mencionada anteriormente que incluye *bla<sub>LAP-2</sub>*. 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')-lb-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')-lb* y su variante *aac(6')-lb-cr* ya ha sido previamente reportada.<sup>154</sup> 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')-lb-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<sub>CTX-M-2</sub>* en la *vr-2* como en In35<sup>155</sup>, 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')-lb-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')-lb-cr5* en integron twin

En dos plásmidos pKpn\_M9314\_63 y pCfr\_Q4143\_61 se encontró a *aac(6')-lb-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<sub>OXA-1</sub>*, y  $\Delta catB3$  (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')-lb-cr5 /bla<sub>OXA-1</sub>/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 ≥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')-lb-cr5/bla<sub>OXA-1</sub>/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')-lb-cr5/bla<sub>OXA-1</sub>/ΔcatB3/ΔIS26*, donde ΔIS26 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')-lb-cr*.

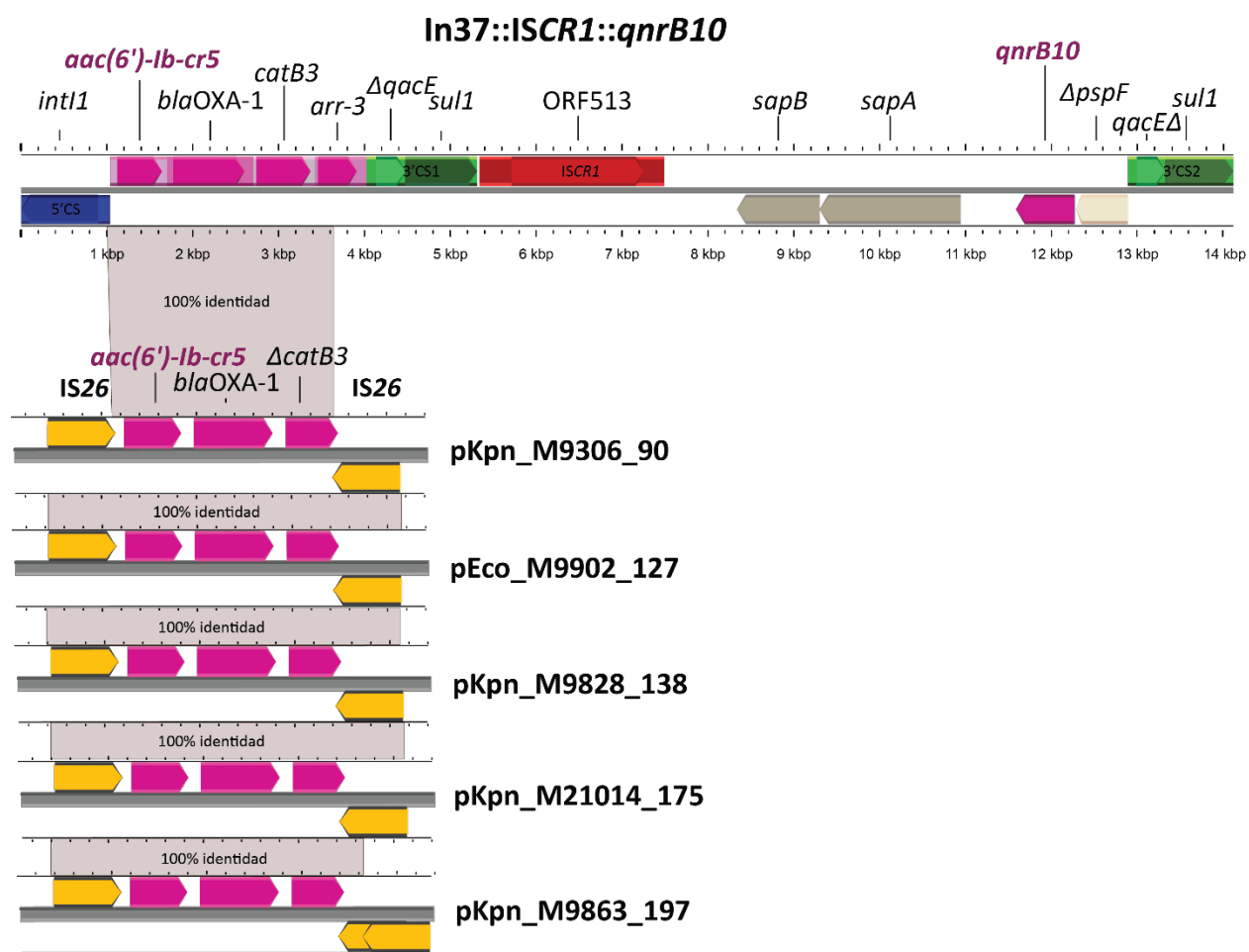


Figura 77. Comparación del In37::ISCR1::qnrB10 con la estructura de los casetes *aac(6')-Ib-cr5*, *bla<sub>OXA-1</sub>* y *ΔcatB3* flanqueada por IS26, encontrada en cinco plásmidos de la plasmoteca. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican 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*<sub>CTX.M-15</sub> secuenciado en su totalidad. Se estima que plásmidos similares a pC15-1a podrían estar relacionado con brotes ocurrido en India.<sup>106</sup> 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.<sup>156</sup>

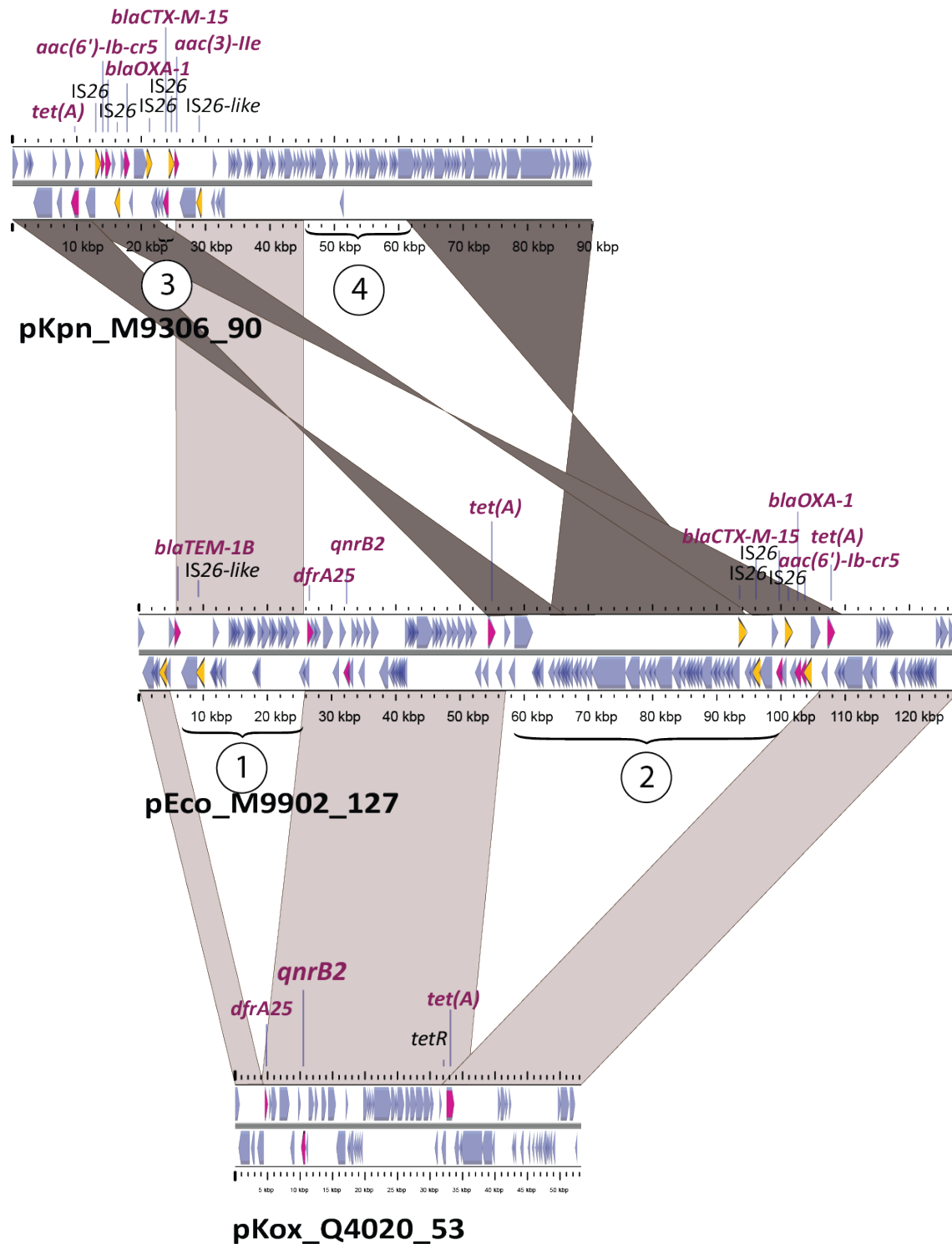
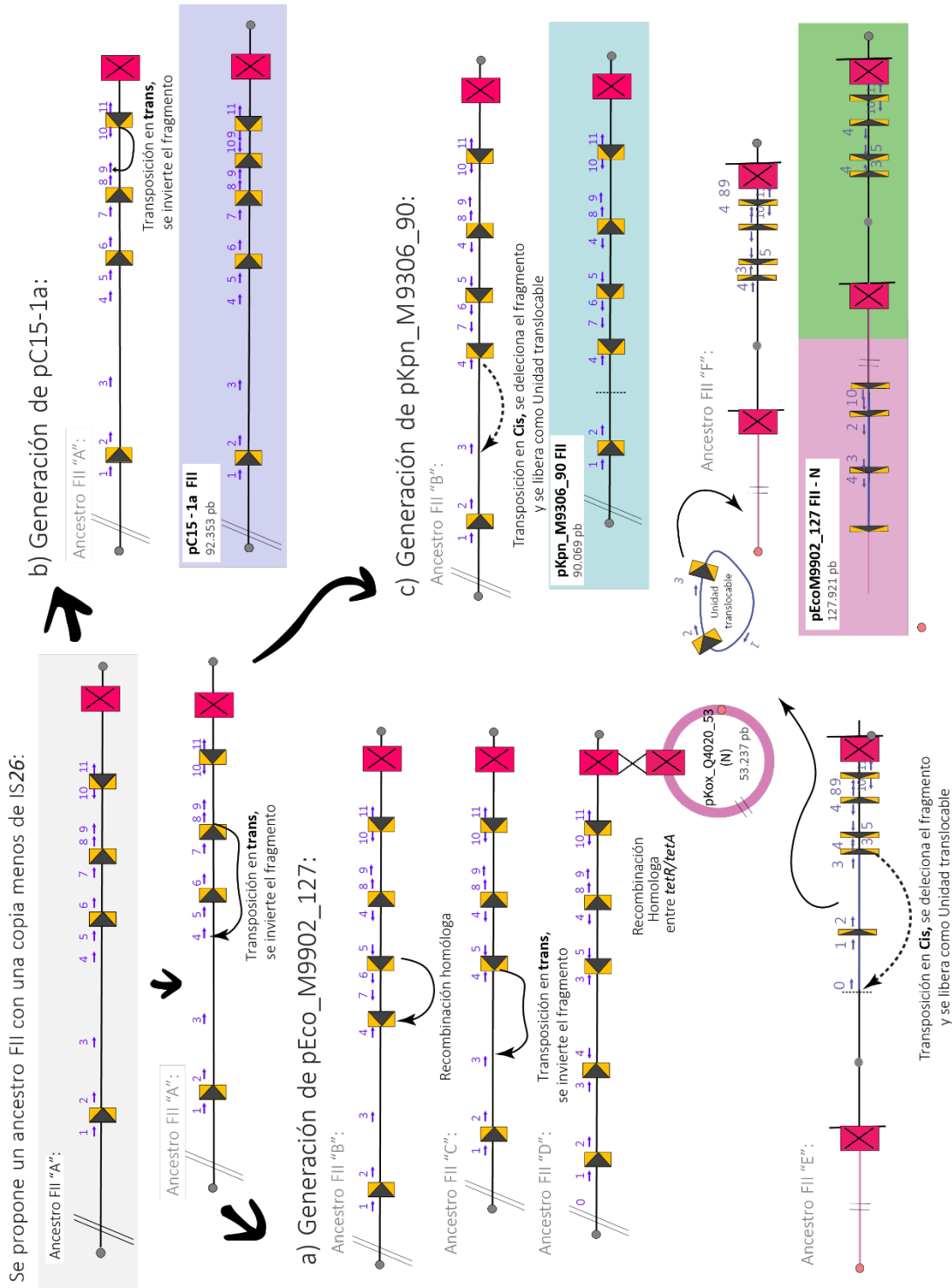


Figura 78. Alineamiento entre los plásmidos pKox\_Q4020\_53 y pKpn\_M9306\_90 que se encuentran relacionados con el plásmido híbrido pEco\_M9902\_127. Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación 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 rearreglos 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.<sup>157</sup> Mediante estas “huellas” genéticas y siguiendo los modelos de transposición descritos en la bibliografía para IS26, se pueden proponer rearreglos 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 rearreglos 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 rearreglos: 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.

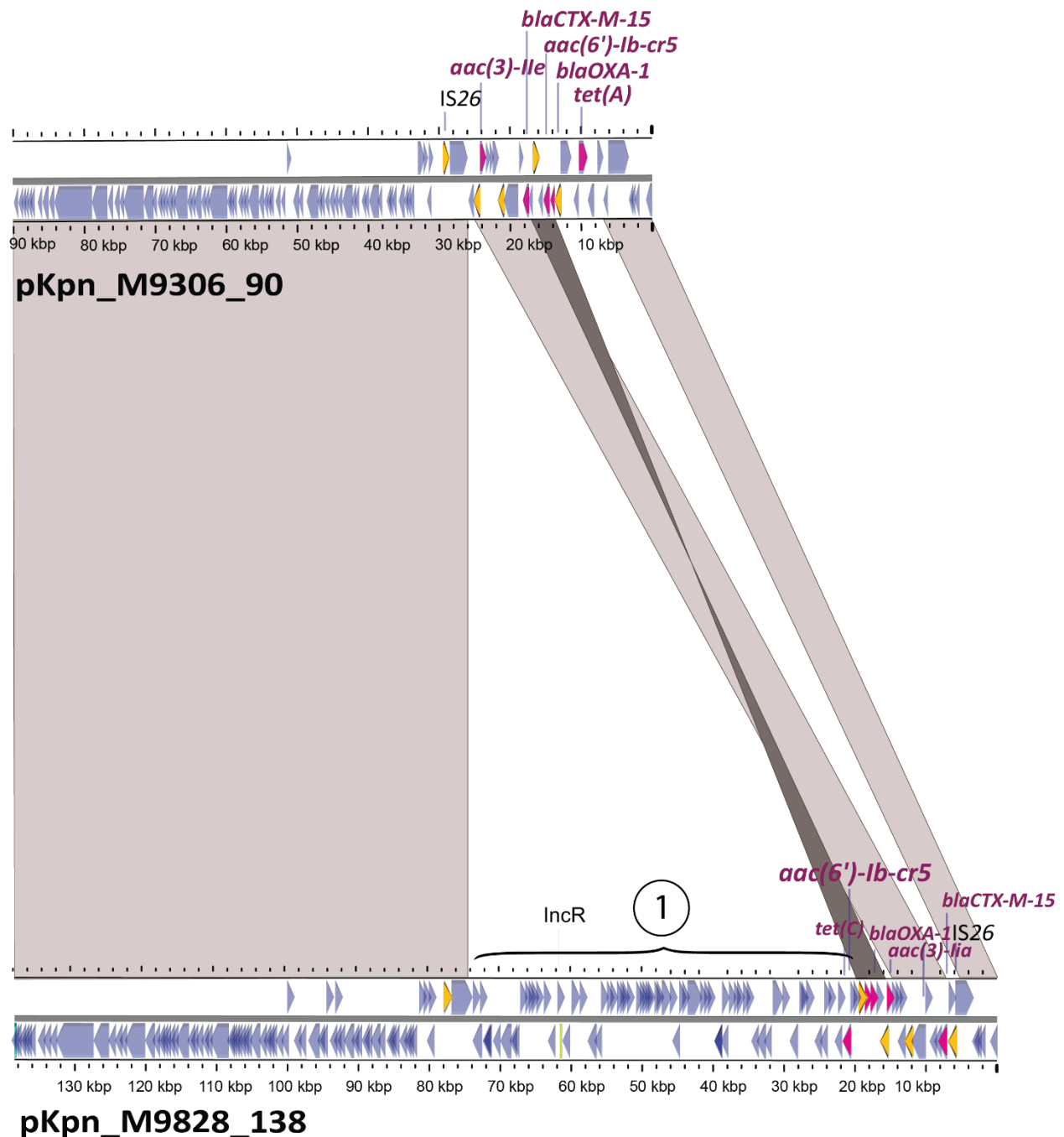
Cabe destacar que estos eventos no ocurrieron necesariamente en el orden temporal propuesto, pero se describieron de esta manera, ya que explican satisfactoriamente la obtención de la secuencia que representa el resultado final de los rearreglos genómicos mencionados.



**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.

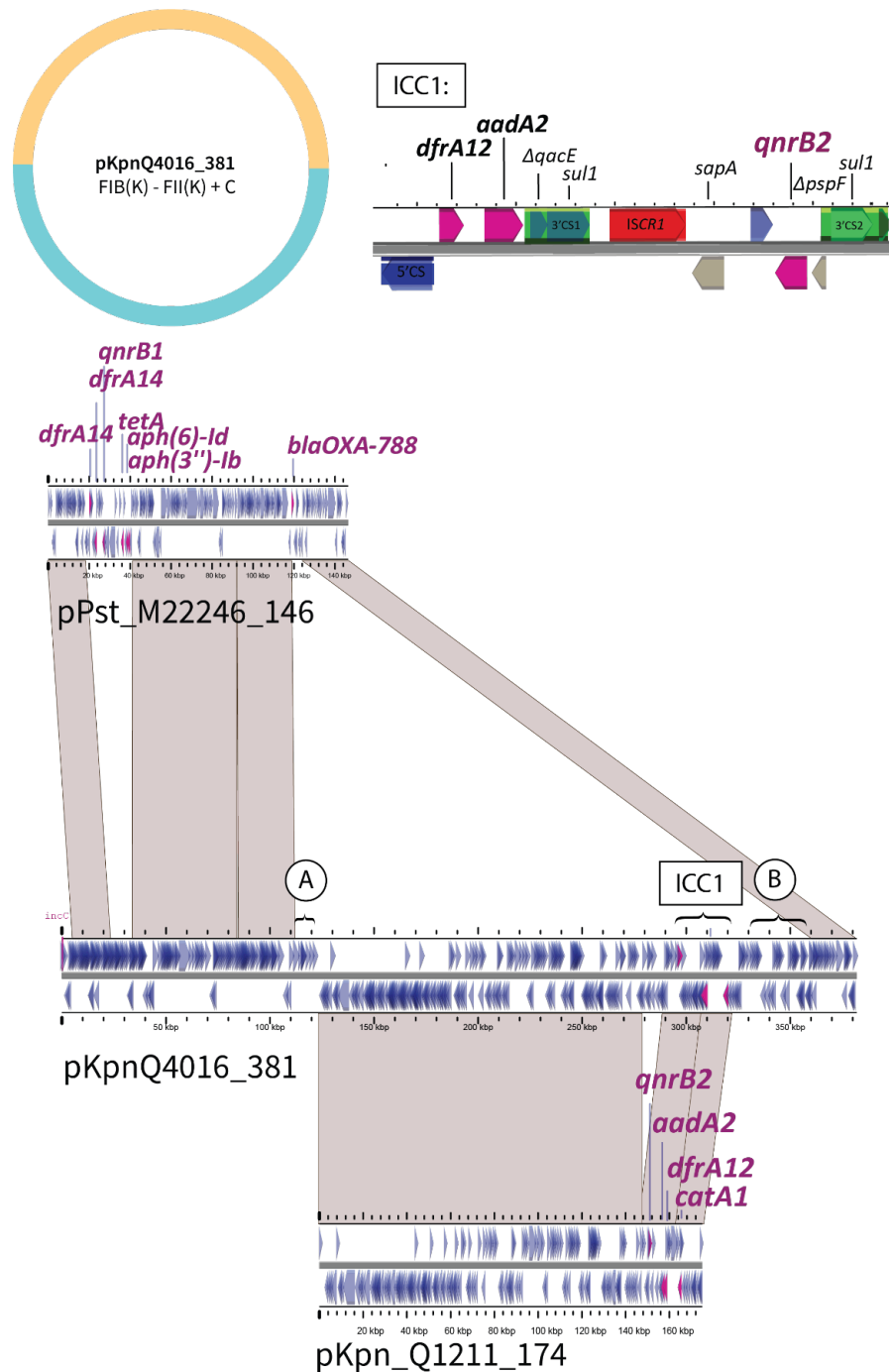
En definitiva, la razón por la cual se habría seleccionado el plásmido fusión pEco\_M9902\_127 se puede explicar mediante la sumatoria de genes de RAM. Bajo esta hipótesis, el plásmido pKox\_Q4020\_53 aportó los genes *qnrB2* y *dfrA25* localizados en un ICC1 (sección 5.06

- d), mientras que pKpn\_M9306\_90 contribuyó con otros genes de RAM adicionales: *bla*<sub>CTXM-15</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> 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.



**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.

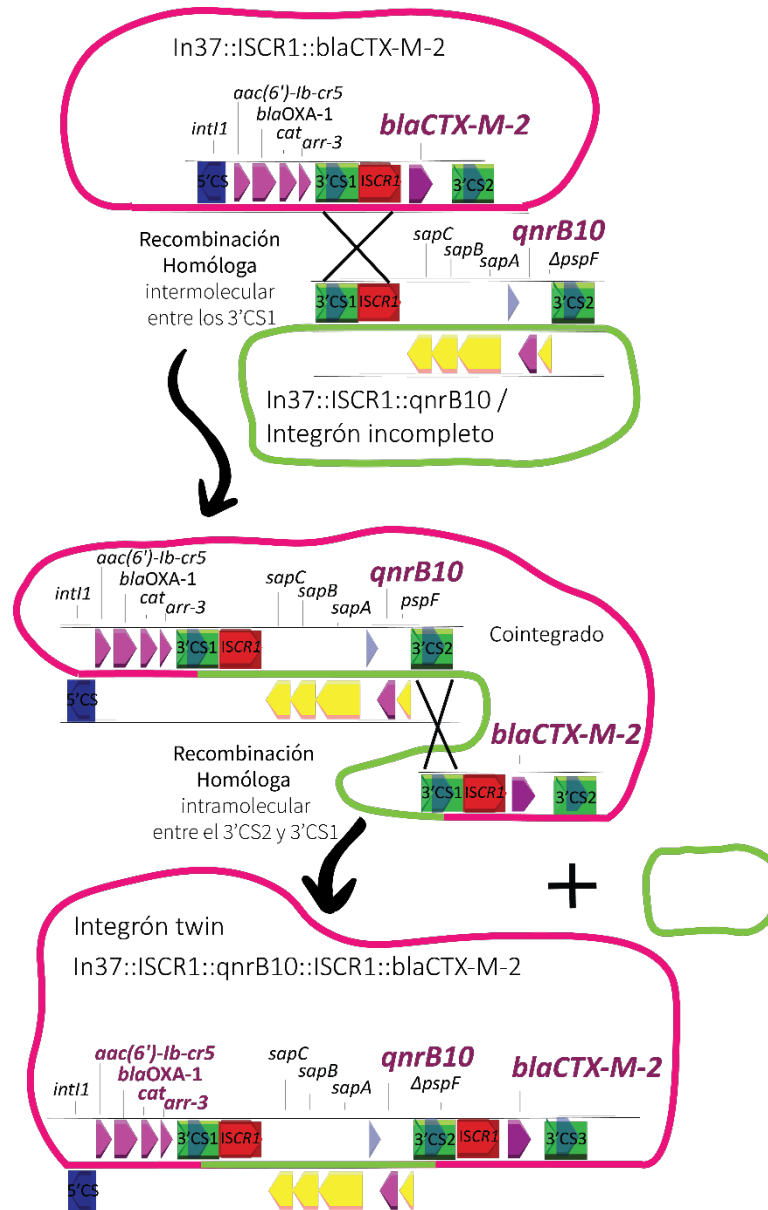
### (c) Origen de los integrones twin con *qnrB10* y *bla*<sub>CTX-M-2</sub>

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*<sub>CTX-M-2</sub>. 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*<sub>CTX-M-2</sub>. Cabe destacar, que el 3'CS2 de los ICC1 con *qnrB10* es distinto del correspondiente a los ICC1 con *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. 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*<sub>OXA-1</sub>, *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*<sub>CTX-M-2</sub> 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*<sub>CTX-M-2</sub> en la vr-2. Siguiendo la nomenclatura propuesta para los ICC1<sup>82</sup>, estos integrones se denominaron *In37::ISCR1::bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

Los dos plásmidos pEae\_M9518\_55 y pKpn\_Q3094\_56 portadores de *In37::ISCR1::bla*<sub>CTX-M-2</sub>, 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*<sub>CTX-M-2</sub> 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*<sub>CTX-M-2</sub>, 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*<sub>CTX-M-2</sub>/3'CS3 del *In37::ISCR1::bla*<sub>CTX-M-2</sub> (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::ISC1::qnrB10* en el mundo.<sup>82</sup> 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.

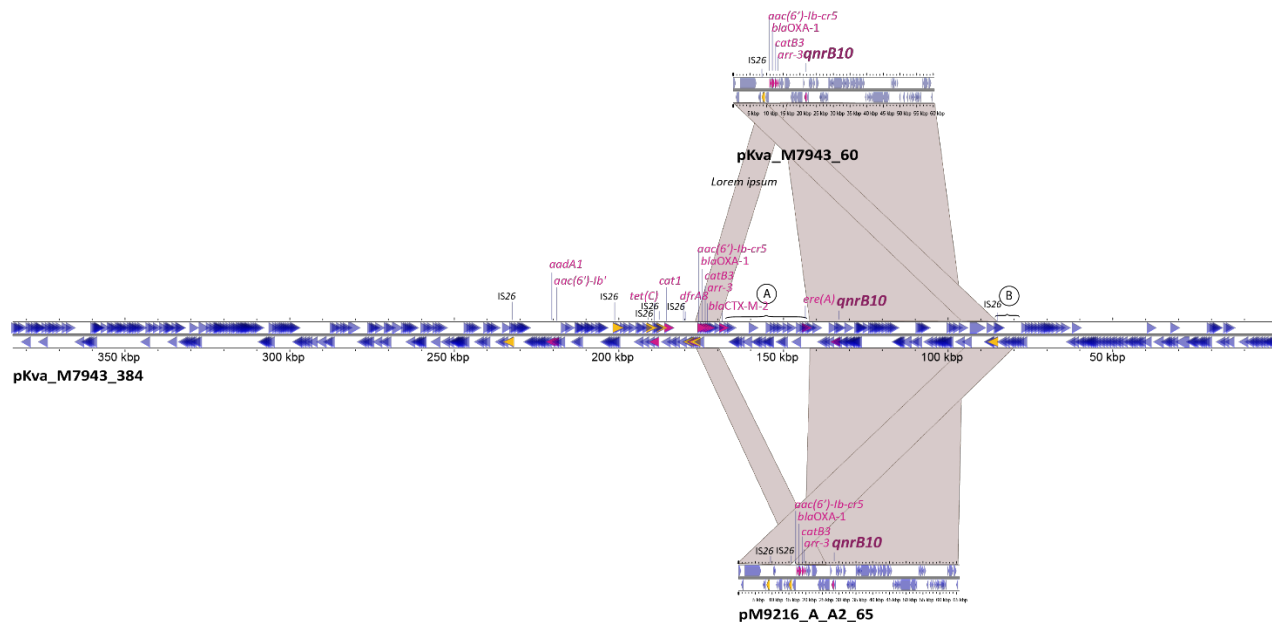
El ensamble híbrido de las secuencias de TC-M9216 resultó en un plásmido de 65.896 pb, que se denominó pM9216\_A\_A2\_65 y también perteneció al grupo N. Este tamaño coincidió con lo que se estimó por endonucleasa S1 (Tabla 13). Para el aislamiento clínico M7943 se obtuvieron plásmidos de 87.911 y 384.128 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       |
|---------------------------------------|------------|---------------|-----------------|-------------|
| <b>M7943</b><br>(Dadora)              | 372        | 384.128       | pKva_M7943_384  | HI, HI2A, N |
|                                       | 83         | 87.911        |                 | IncFIB(K)   |
| <b>TC-M9216</b><br>(Transconjugante)  | 62         | 65.896        | pM9216_A_A2_65  | N           |
| <b>TC-M23825</b><br>(Transconjugante) | <b>369</b> | <b>60.263</b> | pKva_M7943_60   | N           |

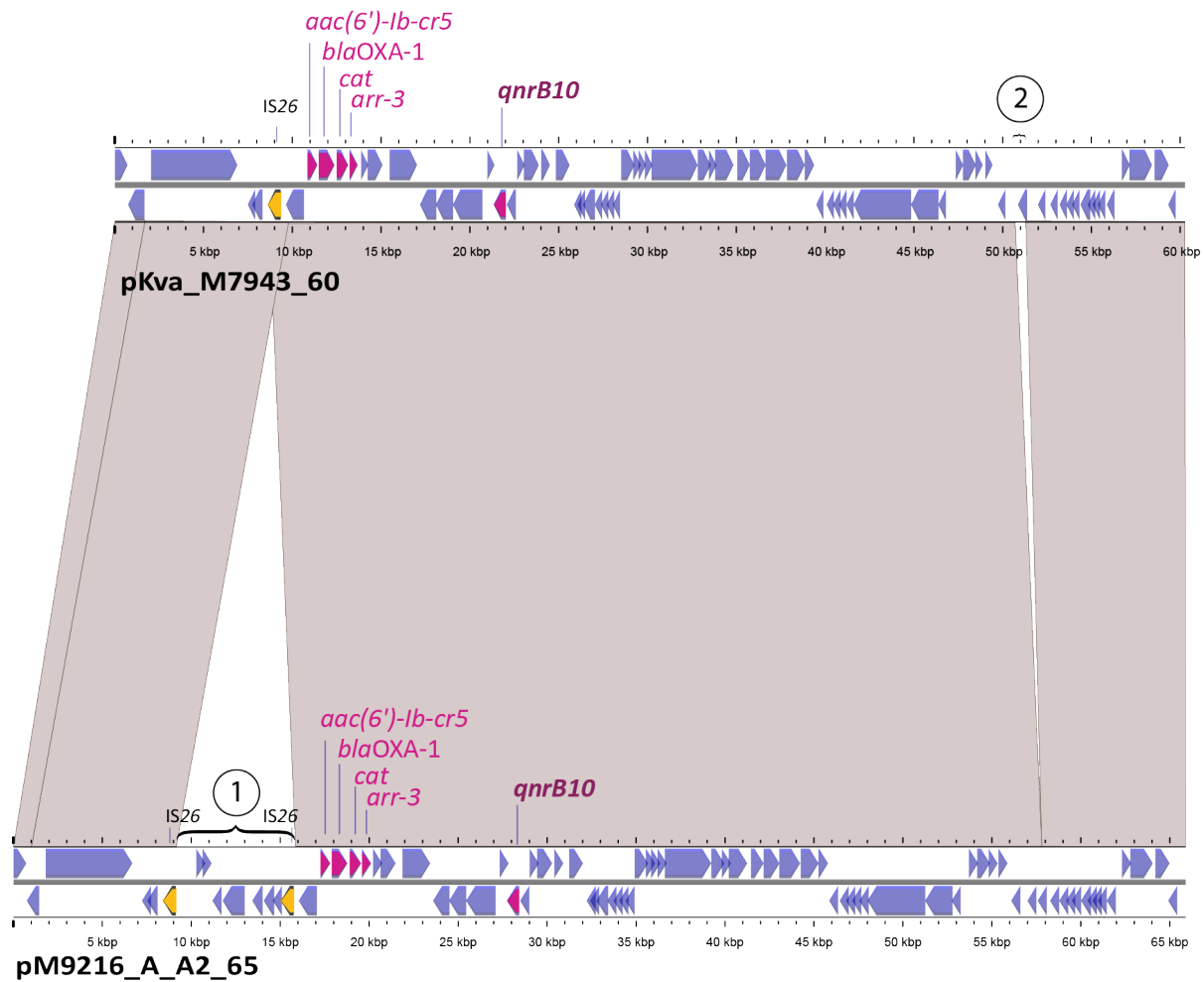
En naranja se resaltan los valores conflictivos.

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).



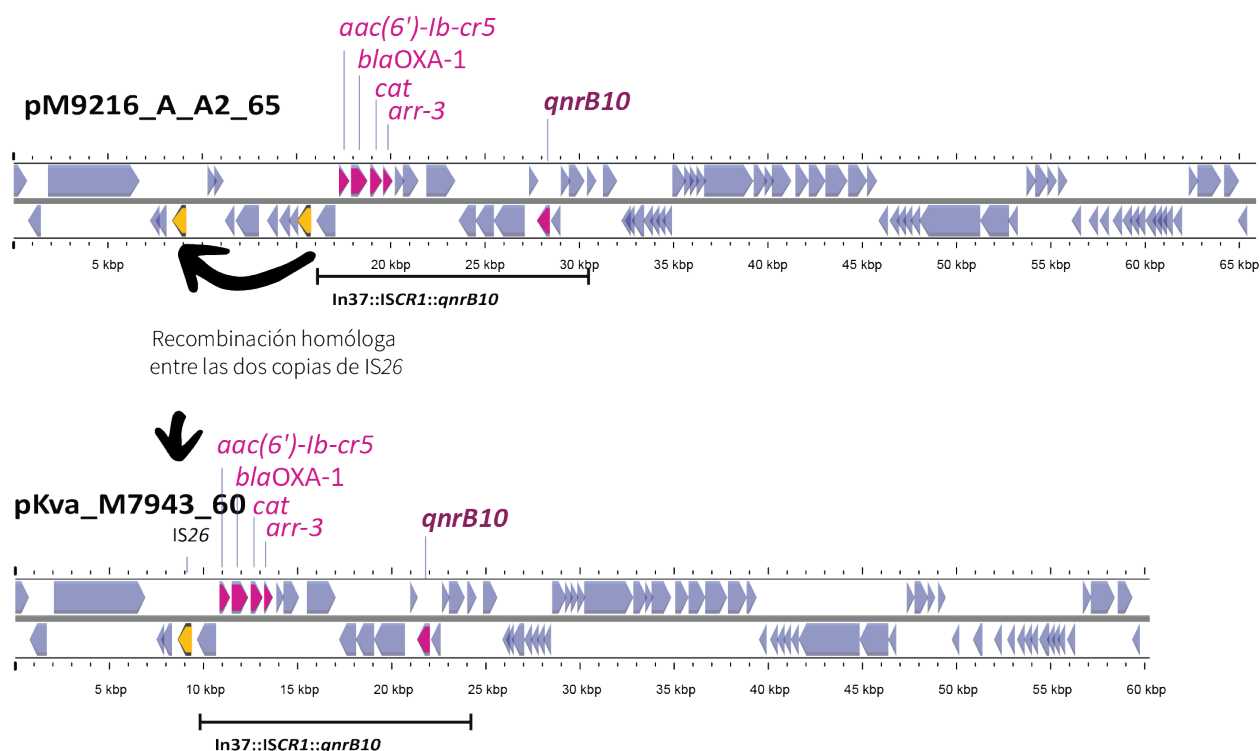
**Figura 83. Alineamiento entre pKva\_M7943\_60, pM9216\_A\_A2\_65 y pKva\_M7943\_384.** Las líneas grises gruesas representan las secuencias de cada uno de los plásmidos, por arriba y abajo de ellas indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes 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.

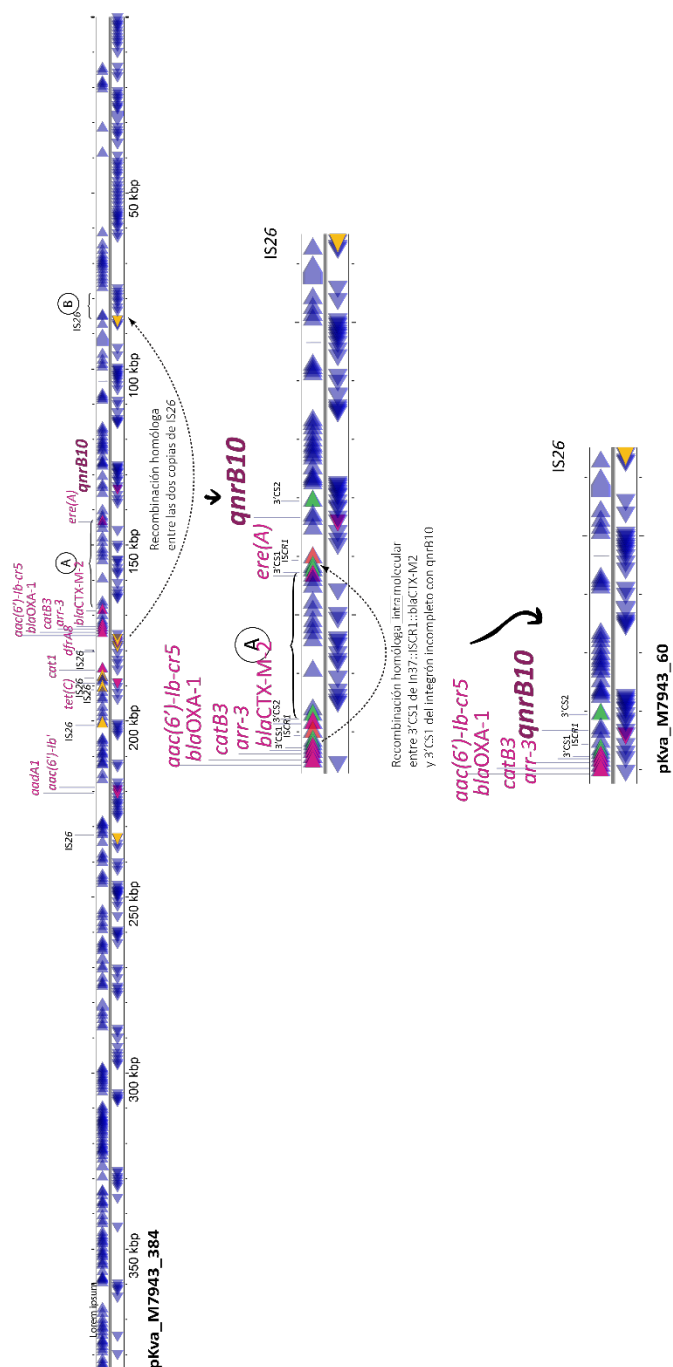
Este segundo rearreglo se podría explicar mediante dos maneras. La primera, consiste en que se haya dado una recombinación homóloga intramolecular entre las dos IS26, y de esta manera se escindió el fragmento de 5.801 pb (Figura 85).



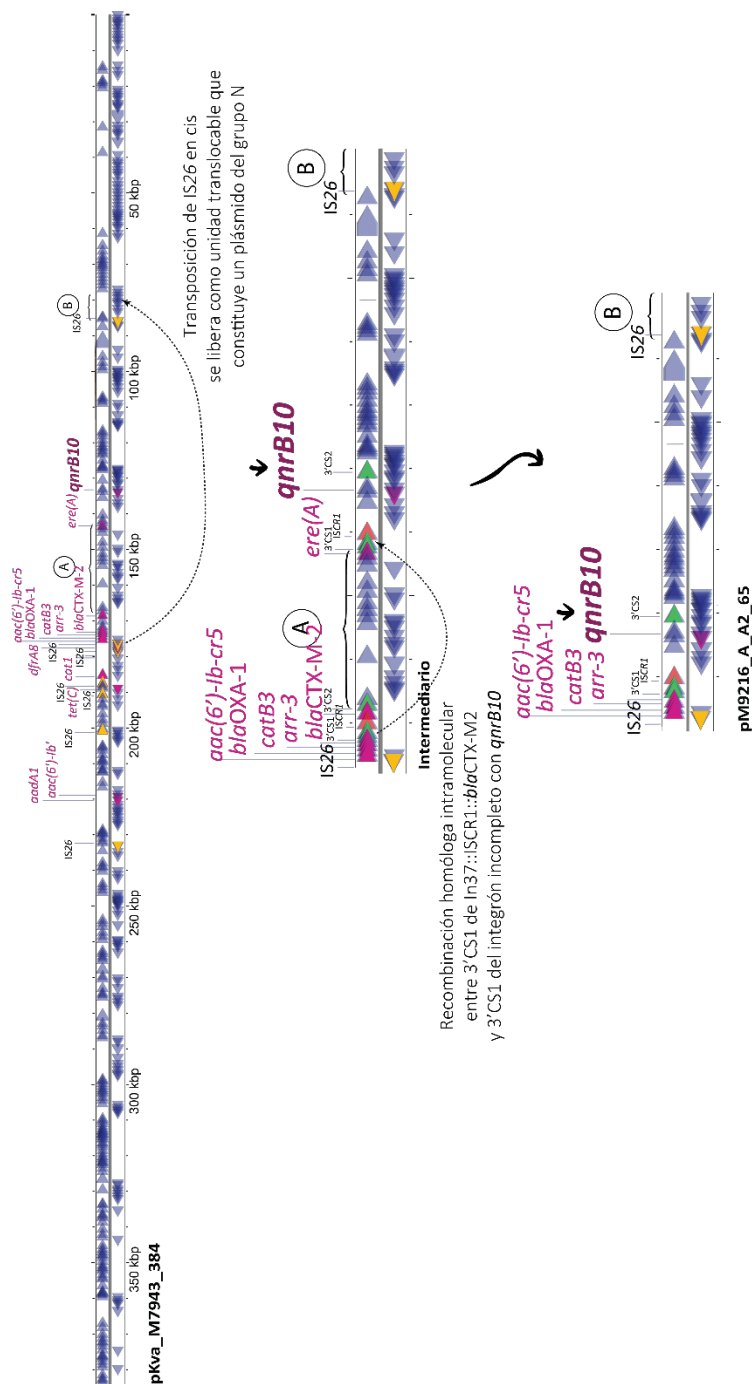
**Figura 85. Modelo de recombinación homóloga entre las dos copias de IS26 que daría lugar a la diferencia entre pKva\_M7943\_60 y pM9216\_A\_A2\_65.** Por arriba y abajo de la línea gris gruesa se indican los genes y ORFs (flechas) en orientación directa y complementaria, respectivamente. Los genes 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<sub>CTX-M-2</sub>. 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::bla<sub>CTX-M-2</sub>.



**Figura 87. Modelo que explica los dos rearreglos 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 rearreglos 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::bla<sub>CTX-M-2</sub> 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<sub>CTX-M-2</sub>. Este evento daría lugar 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<sub>CTX-M-2</sub>.

# 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 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.

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 plasmidica 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

---

- <sup>1</sup> 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>
- <sup>2</sup> 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>
- <sup>3</sup> 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>
- <sup>4</sup> 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>
- <sup>5</sup> World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>.
- <sup>6</sup> 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/ejhp-2016-001013>
- <sup>7</sup> 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)
- <sup>8</sup> 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>.
- <sup>9</sup> 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>
- <sup>10</sup> 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
- <sup>11</sup> 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>

- <sup>12</sup> 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>
- <sup>13</sup> 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>
- <sup>14</sup> 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>
- <sup>15</sup> 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>
- <sup>16</sup> 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>
- <sup>17</sup> 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>
- <sup>18</sup> 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>
- <sup>19</sup> 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>
- <sup>20</sup> 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>
- <sup>21</sup> 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>
- <sup>22</sup> 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>
- <sup>23</sup> 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>
- <sup>24</sup> 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>
- <sup>25</sup> 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>

- <sup>26</sup> 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>
- <sup>27</sup> 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>
- <sup>28</sup> 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>
- <sup>29</sup> 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 IncHI2 plasmids pT5282-mphA and p112298-catA and the IncHI5 plasmid pYNKP001-dfrA. *International journal of antimicrobial agents*, 49(6), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.021>
- <sup>30</sup> Villa, L., Poirel, L., Nordmann, P., Carta, C., & Carattoli, A. (2012). Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1645–1650. <https://doi.org/10.1093/jac/dks114>
- <sup>31</sup> Taylor D. E. (2009). Thermosensitive nature of IncHI1 plasmid transfer. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2703. <https://doi.org/10.1128/AAC.00230-09>
- <sup>32</sup> 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>
- <sup>33</sup> 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)
- <sup>34</sup> 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>
- <sup>35</sup> 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>
- <sup>36</sup> 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>
- <sup>37</sup> 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>
- <sup>38</sup> 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>
- <sup>39</sup> 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>

- <sup>40</sup> 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>
- <sup>41</sup> 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)
- <sup>42</sup> 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>
- <sup>43</sup> 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>
- <sup>44</sup> 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>
- <sup>45</sup> 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>
- <sup>46</sup> 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>
- <sup>47</sup> 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>
- <sup>48</sup> 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>
- <sup>49</sup> 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>
- <sup>50</sup> 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>
- <sup>51</sup> 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>
- <sup>52</sup> Weaver R. F. (2012). *Molecular biology* (5th ed.). McGraw-Hill.
- <sup>53</sup> 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>
- <sup>54</sup> 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>
- <sup>55</sup> 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>

- <sup>56</sup> 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>
- <sup>57</sup> 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>
- <sup>58</sup> 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>
- <sup>59</sup> 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>
- <sup>60</sup> 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>
- <sup>61</sup> Alós J. I. (2003). Quinolonas [Quinolones]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(5), 261–272. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(03\)72932-2](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(03)72932-2)
- <sup>62</sup> 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>
- <sup>63</sup> 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>
- <sup>64</sup> 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>
- <sup>65</sup> 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>
- <sup>66</sup> 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)
- <sup>67</sup> 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>
- <sup>68</sup> 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>
- <sup>69</sup> 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>
- <sup>70</sup> 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>

- <sup>71</sup> 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>
- <sup>72</sup> 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>
- <sup>73</sup> 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>
- <sup>74</sup> 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>
- <sup>75</sup> 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)
- <sup>76</sup> 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>
- <sup>77</sup> 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>
- <sup>78</sup> 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>
- <sup>79</sup> 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>
- <sup>80</sup> 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>
- <sup>81</sup> 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>
- <sup>82</sup> 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>

- <sup>83</sup> 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>
- <sup>84</sup> 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>
- <sup>85</sup> 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>
- <sup>86</sup> 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>
- <sup>87</sup> 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>
- <sup>88</sup> 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.01463-10> Fortini 2012, JAC 66(6) 1269-72.
- <sup>89</sup> Fortini, D., Fashae, K., García-Fernández, A., Villa, L., & Carattoli, A. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance and  $\beta$ -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>
- <sup>90</sup> Cordeiro, N. F., Nabón, A., García-Fulgueiras, V., Álvarez, 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>
- <sup>91</sup> 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>
- <sup>92</sup> 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>
- <sup>93</sup> 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>
- <sup>94</sup> 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>

<sup>95</sup> 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>

<sup>96</sup> 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>

<sup>97</sup> 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>

<sup>98</sup> 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- $\beta$ -lactamase (blaNDM-1) and qnrD-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomycin 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>

<sup>99</sup> 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>

<sup>100</sup> 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*<sub>CTX-M-8</sub> from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(9), e00592-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00592-17>

<sup>101</sup> 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>

<sup>102</sup> 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>

<sup>103</sup> 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>

<sup>104</sup> 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>

<sup>105</sup> 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>

- <sup>106</sup> 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>
- <sup>107</sup> 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>
- <sup>108</sup> 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>
- <sup>109</sup> 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
- <sup>110</sup> 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.
- <sup>111</sup> 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>
- <sup>112</sup> <https://github.com/rrwick/Porechop>
- <sup>113</sup> 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>
- <sup>114</sup> <https://github.com/sanger-pathogens/assembly-stats>
- <sup>115</sup> 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>
- <sup>116</sup> 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>
- <sup>117</sup> <https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>
- <sup>118</sup> 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>
- <sup>119</sup> 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>
- <sup>120</sup> <https://github.com/rrwick/Tracycler/wiki/How-to-run-Tracycler>

- <sup>121</sup> 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>
- <sup>122</sup> 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>
- <sup>123</sup> 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>
- <sup>124</sup> 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>
- <sup>125</sup> 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>
- <sup>126</sup> 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>
- <sup>127</sup> 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>
- <sup>128</sup> 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>
- <sup>129</sup> 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>
- <sup>130</sup> 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>
- <sup>131</sup> 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>
- <sup>132</sup> 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>
- <sup>133</sup> 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..
- <sup>134</sup> 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>

- <sup>135</sup> Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- <sup>136</sup> 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>
- <sup>137</sup> 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)
- <sup>138</sup> 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>
- <sup>139</sup> 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>
- <sup>140</sup> <https://www.atcc.org/>
- <sup>141</sup> 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*<sub>OXA-58</sub>- and *TnaphA6*-Resistance Module in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in microbiology*, 9, 66. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00066>
- <sup>142</sup> Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, 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>
- <sup>143</sup> 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>
- <sup>144</sup> 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>
- <sup>145</sup> Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, 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>
- <sup>146</sup> 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>
- <sup>147</sup> 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)
- <sup>148</sup> 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>

- 
- <sup>149</sup> 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>
- <sup>150</sup> Poirel, L., Lartigue, M. F., Decousser, 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>
- <sup>151</sup> 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>
- <sup>152</sup> Poirel, L., Lartigue, M. F., Decousser, 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>
- <sup>153</sup> 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>
- <sup>154</sup> 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>
- <sup>155</sup> 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>
- <sup>156</sup> 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>
- <sup>157</sup> 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

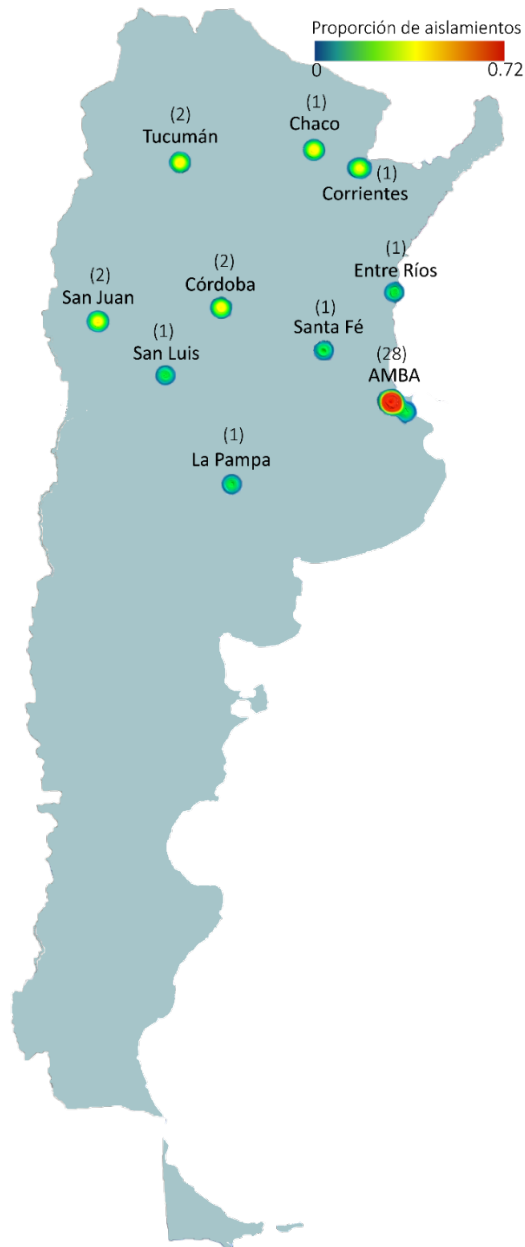
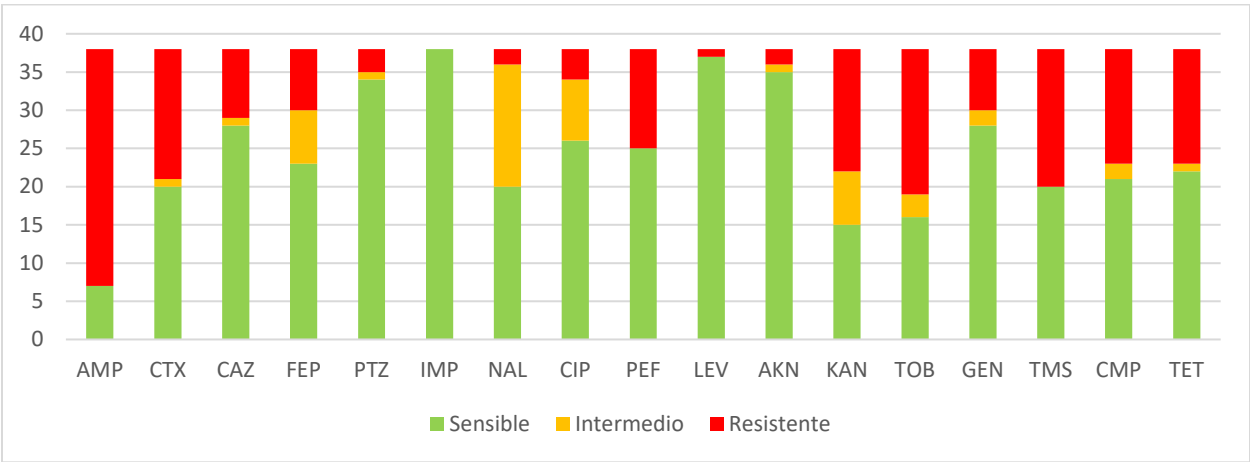


Figura S1. Localización de hospitales en los que se recolectaron los 40 aislamientos clínicos seleccionados para la construcción de la plasmoteca. El número de hospitales de cada jurisdicción se indica entre paréntesis. El porcentaje de aislamientos de cada jurisdicción, se indica con los círculos coloreados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

| Cepa      | 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<br>4 | 25        | 21  | 6   | 6   | 14  | 6   | 6   | 25  |
| TC-M23665 |      | 6   | 18  | 10  | 23  | 32  | +    | 30  | 18  | 22        | 25        | 24/3<br>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<br>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<br>5 | 22        | 24/3<br>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<br>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<br>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<br>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<br>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-<br>M23252 |      | 6  | 20 | 15 | 21 | 28 | +  | 31 | 21 | 23                  | 24 | $\frac{24}{3}$<br>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-<br>M23226 |      | 6  | 21 | 11 | 23 | 32 | +  | 33 | 20 | $\frac{29}{4}$<br>0 | 25 | $\frac{27}{3}$<br>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-<br>M23174 |      | 6  | 20 | 12 | 27 | 31 | +  | 33 | 16 | $\frac{25}{3}$<br>3 | 22 | $\frac{24}{3}$<br>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-<br>M23152 |      | 6  | 36 | 32 | 36 | 30 | -  | 32 | 18 | $\frac{28}{3}$<br>8 | 25 | $\frac{25}{3}$<br>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-<br>M23125 |      | 6  | 37 | 33 | 35 | 26 | -  | 30 | 24 | 30                  | 31 | $\frac{34}{4}$<br>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-<br>M23097 |      | 6  | 35 | 38 | 25 | 17 | -  | 29 | 23 | 31                  | 31 | $\frac{32}{4}$<br>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-<br>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-<br>M23337 |      | 6  | 30 | 33 | 26 | 20 | NC | 28 | 24 | 31                  | 36 | $\frac{33}{4}$<br>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-<br>M23338 |      | 25 | 38 | 34 | 35 | 31 | NC | 33 | 24 | 32                  | 31 | $\frac{34}{4}$<br>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-<br>M23384 |      | 6  | 15 | 30 | 19 | 23 | +  | 30 | 24 | 36                  | 36 | $\frac{33}{4}$<br>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-<br>M23386 |      | 6  | 36 | 32 | 27 | 26 | -  | 31 | 26 | 31                  | 39 | $\frac{35}{4}$<br>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<br>9 | 26        | 26/3<br>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<br>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<br>5 | 32/4<br>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<br>8 | 25        | 26/3<br>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<br>2 | 18        | 24/3<br>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<br>5 | 22        | 24/3<br>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<br>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<br>5 | 24        | 25/3<br>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<br>8 | 30        | 27/3<br>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 | 26/4<br>5 | 21 | 23/3<br>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 | 27/3<br>8 | 21 | 26/3<br>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  | 14 |
| TC-M25208 |            | 6  | 6  | 6  | 19 | 15 |   | 20 | 15 | 28/3<br>3 | 21 | 30        | 6  | 6  | 6  | 6  | 6    | 6  | 27 |
| M17277    | <i>Kpn</i> | 6  | 6  | 6  | 11 | 6  | + | 14 | 6  | 9         | 7  | 6         | 6  | 6  | 6  | 6  | 6    |    | 6  |
| TC-M25520 |            | 6  |    | 19 | 32 | 31 |   | 28 | 20 | 30/4<br>0 | 25 | 30/3<br>8 | 28 | 24 | 17 | 7  | 6    | 6  |    |
| TC-M25207 |            | 24 | 42 | 38 | 42 | 32 | - | 35 | 16 | 28        | 26 | 29/3<br>5 | 18 | 25 | 20 | 26 | 6/29 | 6  |    |
| M21014    | <i>Kpn</i> | 6  | 24 | 24 | 23 | 9  | - | 17 | 6  | 6         | 6  | 7         | 17 | 9  | 6  | 6  | 6    | 6  | 6  |
| M21217    |            | 6  | 37 | 34 | 36 | 21 | - | 27 | 22 | 22        | 21 | 25/3<br>0 | 25 | 13 | 7  | 14 | 6    | 21 | 6  |
| M22246    | <i>Pst</i> | 6  | 27 | 24 | 25 | 21 | - | 21 | 6  | 6         | 6  | 6         | 25 | 22 | 10 | 13 | 6    | 6  | 6  |
| M22714    |            | 6  | 34 | 28 | 37 | 24 | - | 28 | 27 | 27        | 1  | 25/3<br>0 | 25 | 28 | 22 | 25 | 6    | 22 | 6  |
| M21692    | <i>Ecl</i> | 6  | 10 | 6  | 12 | 8  | - | 24 | 11 | 12        | 12 | 19        | 17 | 9  | 7  | 19 | 6    | 19 | 6  |
| Q4160     | <i>Eco</i> | 6  | 9  | 20 | 17 | 27 | + | 27 | 6  | 23        | 13 | 18        | 24 | 6  | 7  | 12 | 6    | 15 | 6  |