



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Origen y evolución de los genes que confieren resistencia clínica a sulfamidas y a trimetoprim

Miquel Sánchez Osuna

Tesis Doctoral

Bellaterra, 2020

Directores: Dr. Jordi Barbé García, Dra. Montserrat Llagostera Casas, Dr. Ivan Erill Sagalés

Departament de Genètica i de Microbiologia - Facultat de Biociències



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Universitat Autònoma
de Barcelona

Memoria presentada por **Miquel Sánchez Osuna** para optar al grado de Doctor en el Programa de Doctorado en Microbiología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Miquel Sánchez Osuna

Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. Jordi Barbé García, la Dra. Montserrat Llagostera Casas y el Dr. Ivan Erill Sagalés.

Dr. Jordi Barbé García Dr. Ivan Erill Sagalés

Dra. Montserrat
Llagostera Casas

Bellaterra, 2020

A los que no están

RESUMEN

La resistencia a los compuestos antibacterianos es un grave problema en la sanidad moderna, tanto humana como animal. Está ampliamente demostrado que la resistencia a los antibióticos surgió hace millones de años en bacterias productoras de estos compuestos o en sus competidoras. No obstante, la resistencia a los agentes antibacterianos sintéticos no se puede explicar por el mismo mecanismo, ya que no se producen de forma natural. Por consiguiente, se ha asumido que la resistencia a este tipo de compuestos emergió y ha evolucionado rápidamente a partir de su aplicación en la terapia antibacteriana. La resistencia clínica a las sulfamidas y al trimetoprim se debe principalmente a la presencia de los genes móviles *sul* y *dfr*, respectivamente. Estos genes codifican versiones alternativas y funcionales de las enzimas dihidropteroato sintasa y dihidrofolato reductasa que no son inhibidas por la acción de estos antibacterianos, a diferencia de los genes bacterianos *folP* y *folA* que codifican las variantes cromosómicas de estas enzimas, típicamente sensibles a los citados agentes quimioterapéuticos.

El objetivo central de la presente Tesis Doctoral ha sido la identificación del origen de los genes que confieren resistencia clínica a las sulfamidas y al trimetoprim, así como el análisis del proceso evolutivo que ha dado lugar a las actuales variantes enzimáticas.

Para ello, se han analizado las secuencias de los genes *sul* y su entorno para detectar elementos que permitiesen la elucidación de su origen. De este modo, se ha identificado un motivo Sul presente en las secuencias de las proteínas codificadas por los genes móviles *sul1*, *sul2* y *sul3*, que confieren resistencia a las sulfamidas, así como la asociación física en múltiples plásmidos del gen *sul2* con un fragmento del gen *glmM* que codifica una fosfoglucomutasa. El estudio comparativo de las secuencias de los genes *folP* cromosómicos de todo el dominio *Bacteria* ha permitido identificar la presencia del motivo Sul en las proteínas codificadas en los genes *folP* de dos familias bacterianas: *Rhodobiaceae* y

Leptospiraceae. El análisis filogenético de las proteínas FolP/Sul y GlmM ha establecido claramente que los genes *sul1-2* y *sul3* se originaron mediante sendos procesos de movilización independientes de los genes *folP* cromosómicos presentes, respectivamente, en *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae*. Asimismo, los ensayos *in vitro* han revelado que los genes *folP* codificados en *Rhodobiaceae* y en *Leptospiraceae* confieren resistencia a sulfamidas. Estos resultados indican que la resistencia a las sulfamidas es ancestral y anterior a la introducción clínica de este antibacteriano.

Por otro lado, se analizó el origen y evolución de los genes móviles *dfrA* que confieren resistencia al trimetoprim. Al contrario de lo descrito para los genes *sul*, los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias existentes de genes *dfrA* móviles indican que éstos se han originado mediante múltiples eventos de transferencia lateral de genes *folA* cromosómicos. Asimismo, se ha podido establecer que muchos de los genes cromosómicos *folA* predecesores de los *dfrA* también confieren resistencia a trimetoprim. Todo ello revela que la resistencia a trimetoprim determinada por elementos móviles se puede explicar por dos procesos independientes y complementarios: i) la captación de genes *folA* cromosómicos movilizadores, portadores de una mutación ancestral responsable de dicha resistencia originada en ausencia del quimioterápico, y ii) la transferencia de genes mutantes espontáneos *folA* cromosómicos, presentes en una población bacteriana coetánea con la exposición al citado antibacteriano, y habiendo sido seleccionados por dicha exposición.

Dada la ausencia de productores naturales de sulfamidas y trimetoprim, este trabajo concluye que en el pangenoma bacteriano pueden existir genes determinantes de resistencia frente a nuevos compuestos, que son susceptibles de ser seleccionados, movilizadores y diseminados rápidamente tras la aplicación clínica de estos nuevos agentes quimioterapéuticos.

RESUM

La resistència als compostos antibacterians és un greu problema a la sanitat moderna, tant humana com animal. Està ampliament demostrat que la resistència als antibiòtics va sorgir fa milions d'anys a bacteris productors d'aquests compostos o als seus competidors. No obstant això, la resistència als agents quimioterapèutics no es pot explicar pel mateix mecanisme, ja que no són produïts de forma natural. Per tant, clàssicament s'ha assumit que la resistència a aquest tipus de compostos va emergir i va evolucionar ràpidament a partir de la seva aplicació a la teràpia antibacteriana. La resistència clínica a les sulfamides i al trimetoprim es deu principalment a la presència dels gens mòbils *sul* i *dfr*, respectivament. Aquests gens codifiquen versions alternatives i funcionals dels enzims dihidropteroat sintasa i dihidrofolat reductasa que no són inhibits per l'acció d'aquests antibacterians, a diferència dels gens bacterians *folP* i *folA* que codifiquen les variants cromosòmiques d'aquests enzims i que són típicament sensibles als citats agents antibacterians.

L'objectiu central de la present Tesis Doctoral ha estat la identificació de l'origen dels gens que confereixen resistència clínica a les sulfamides i al trimetoprim, així com l'anàlisi del procés evolutiu que ha donat lloc a les variants enzimàtiques actuals.

Així, s'han analitzat les seqüències dels gens *sul* i el seu entorn amb l'objectiu de detectar elements que permetessin l'elucidació del seu origen. Com a conseqüència d'aquesta anàlisi, s'ha identificat un motiu Sul present a les seqüències de les proteïnes codificades pels gens mòbils *sul1*, *sul2* i *sul3*, que confereixen resistència a les sulfamides, així com la associació física a múltiples plasmidis del gen *sul2* amb un fragment del gen *glmM* que codifica una fosfoglucomutasa. L'estudi comparatiu des les seqüències dels gens *folP* cromosòmics de tot el domini *Bacteria* ha permet identificar la presència del motiu Sul a les proteïnes codificades pels gens *folP* de dues famílies bacterianes:

Rhodobiaceae i *Leptospiraceae*. L'estudi filogenètic de les proteïnes FolP/Sul i GlmM ha establert clarament que els gens *sul1-2* i *sul3* es van originar mitjançant sengles processos de mobilització independents dels gens *folP* cromosòmics presents, respectivament, a *Rhodobiaceae* i *Leptospiraceae*. Tanmateix, els experiments *in vitro* han revelat que els gens *folP* codificats a *Rhodobiaceae* i *Leptospiraceae* confereixen resistència a les sulfamides. Aquests resultats indiquen que la resistència a les sulfamides és ancestral i anterior a la introducció clínica d'aquest agent antibacterià.

D'altra banda, es va analitzar l'origen i la evolució dels gens mòbils *dfrA* que confereixen resistència al trimetoprim. Al contrari del que s'ha descrit pels gens *sul*, els resultats obtinguts de l'anàlisi de les seqüències dels gens *dfrA* mòbils indiquen que aquests s'han originat mitjançant events múltiples de transferència lateral de gens *folA* cromosòmics. Així mateix, s'ha pogut establir que la majoria dels gens cromosòmics *folA* predecessors dels *dfrA* també confereixen resistència al trimetoprim. Tot això revela que la resistència al trimetoprim determinada per elements mòbils es pot explicar per dos processos independents i complementaris: i) la captació de gens *folA* cromosòmics, portadors d'una mutació ancestral responsable d'aquesta resistència i que es va originar en absència del quimioteràpic, i ii) la transferència de mutants espontanis cromosòmics del gen *folA*, presents a una població bacteriana coetània amb l'exposició al citat antibacterià, i havent estat seleccionats per aquesta exposició.

Donada la absència de productors naturals de sulfamides i de trimetoprim, aquests resultats aporten una nova perspectiva sobre la possible aparició de resistència als agents quimioterapèutics de nova generació. Aquest treball conclou que a l'ampli pangenoma bacterià poden existir gens determinants de resistència front a nous compostos, que són susceptibles d'ésser seleccionats, mobilitzats i disseminats ràpidament, després de la introducció clínica d'aquests nou agents quimioterapèutics.

ABSTRACT

Antibacterial resistance is a pressing problem in human and animal modern healthcare. It is widely accepted that antibiotic resistance originated million years ago in either the microbes that naturally produce the antibiotics or their competitors. However, resistance to synthetic chemotherapeutic agents cannot be explained by this mechanism, since these drugs are not naturally produced. Resistance to chemotherapeutic compounds is hence assumed to have emerged and evolved rapidly following the clinical introduction of these compounds. Resistance to sulfonamides and trimethoprim is mediated by mobile *sul* and *dfp* genes, respectively. These genes encode resistant variants of the di-hydro-pterolate synthase and di-hydrofolate reductase enzymes, in contrast to chromosomal *folP* and *folA* genes encoding variants sensitive to these agents.

The overall objective of this Doctoral Thesis is the identification of the chromosomal origin of genes conferring clinical resistance to sulfonamides and trimethoprim, and the study of the evolutionary processes governing their emergence and dissemination.

In this work, *sul* genes and their genetic neighborhoods have been analyzed to uncover elements that enable the elucidation of their genetic origin. This analysis has led to the identification of a Sul motif associated with *sul*-encoded proteins, as well as the observation of a consistent genomic association of the *sul2* gene with a phosphoglucosamine mutase gene (*glmM*). The study of chromosomal *folP* genes across the Bacteria domain revealed the presence of the Sul motif in the chromosomal *folP* genes of two families: the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae*. Phylogenetic analysis of FolP/Sul and GlmM proteins established that the *sul1-2* and *sul3* genes originated through the independent mobilization of chromosomal *folP* genes encoded by the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae*, respectively. *In vitro* experiments revealed that both the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae* chromosomal *folP* genes confer resistance to sulfonamides. These results suggest

that resistance to sulfonamides is ancient and predates the clinical introduction of these drugs.

Likewise, the origin and evolution of mobile *dfrA* genes conferring clinical resistance to trimethoprim have been analysed. The results have shown that, in contrast to *sul* genes, the *dfrA* gene arose from multiple mobilization events from chromosomal *folA*. Furthermore, it has been established that most chromosomal *folA* genes that are predecessors of mobile *dfrA* genes also confer trimethoprim resistance. Taken together, these results indicate that the resistance to trimethoprim determined by mobile elements can be explained by two independent and complementary processes: i) the mobilization of chromosomal *folA* genes carrying an ancestral mutation originated in the absence of trimethoprim and responsible for trimethoprim resistance, and ii) the mobilization of spontaneous mutants in chromosomal *folA* genes, present in a bacterial population coetaneous with the exposure to trimethoprim, and having been selected by that exposure.

Given the absence of sulfonamides and trimethoprim in nature, these results provide a new perspective on the emergence and dissemination of resistance to new-generation chemotherapeutic agents. Thus, this work concludes that resistant genes may exist in the vast bacterial pangenome and can be selected for and mobilized upon exposure to these new drugs.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infecciones en la era pre-antibiótica	3
1.2 Historia de los antimicrobianos.....	4
1.3 Estrategias de resistencia a los agentes antibacterianos	8
1.4 Mecanismos moleculares de resistencia a las diferentes familias de antibacterianos.....	12
1.4.1 Inhibición de la síntesis de pared celular.....	12
1.4.2 Disrupción de la integridad de la membrana citoplasmática	17
1.4.3 Interrupción de la replicación.....	21
1.4.4 Inhibición de la transcripción.....	25
1.4.5 Bloqueo de la traducción.....	27
1.4.6 Antagonismo del metabolismo del folato.....	40
1.5 Origen y evolución de la resistencia antibacteriana: ¿Regreso a la era pre-antibiótica?.....	45
1.5.1 Resistencia a los antibióticos en los microorganismos productores	46
1.5.2 Evolución y diseminación de los genes de resistencia a antibacterianos.....	49
1.5.3 Bacterias multirresistentes ¿Regreso a la era pre- antibiótica?	56
1.6 Futuras estrategias para combatir la resistencia a compuestos antibacterianos	59
1.6.1 Identificación de nuevas dianas	60
1.6.2 Inmunoterapia	61
1.6.3 Terapia fágica	63

1.6.4 Endolisinas.....	65
1.6.5 Bacterias depredadoras.....	65
2. OBJETIVOS.....	67
3. RESULTADOS	71
3.1 Elucidación del origen cromosómico de las variantes genéticas móviles que confieren resistencia clínica a las sulfamidas	73
3.2 Caracterización del origen cromosómico de los genes móviles que confieren resistencia clínica al trimetoprim	91
4. DISCUSIÓN	107
4.1 Identificación y caracterización de nuevos genes codificados en elementos genéticos móviles que confieren resistencia a sulfamidas y trimetoprim	110
4.2 Evaluación de los procesos evolutivos que gobiernan la emergencia y diseminación de los genes que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim.....	112
4.2.1 Emergencia y mantenimiento de las mutaciones causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim	112
4.2.2 Movilización de las variantes genéticas causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim	115
4.2.3 Evaluación de la diseminación de los genes móviles causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim	120
5. CONCLUSIONES	123
6. REFERENCIAS.....	129
7. AGRADECIMIENTOS.....	169

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones en la era pre-antibiótica

Los antimicrobianos son probablemente una de las herramientas terapéuticas más exitosas en la historia de la medicina. Estos compuestos, conjuntamente con el creciente conocimiento sobre los microorganismos patógenos, han aumentado inmensamente la calidad y la esperanza de vida humana. Así como a principios del siglo XX las enfermedades infecciosas eran la principal causa de muerte en humanos, tras el descubrimiento de los antimicrobianos el porcentaje de muertes como consecuencia de microorganismos patógenos ha disminuido enormemente (Aminov, 2010; Mohr, 2016).

Desde hace miles de años, se sabe que el uso de diferentes hongos, plantas y compuestos orgánicos es efectivo contra el tratamiento de determinadas enfermedades. Uno de los ejemplos más conocidos es el caso de la artemisina, un potente compuesto efectivo contra la malaria, que se extrajo en los años setenta de la planta *Artemisia*, pero que viene usándose desde hace miles de años en la medicina tradicional china para tratar múltiples enfermedades (Aminov, 2010; Cui and Su, 2009). De forma similar, es destacable el uso en Latinoamérica de extractos de plantas del género *Cinchona* para el tratamiento de fiebres y también de la malaria. El compuesto activo más conocido de estos extractos, la quinina, es aun de importancia clínica (Mohr, 2016). Asimismo, en el antiguo Egipto, China, Serbia, Grecia y Roma se aplicaban de forma tópica hongos crecidos en pan para el tratamiento de heridas y quemaduras (Gould, 2016). De hecho, se cree que algunos de los antibióticos modernos podrían haber estado disponibles en la antigüedad ya que se han detectado trazas de tetraciclina en esqueletos humanos en Nubia y en el Oasis Dakhla durante la ocupación romana de Egipto. Sin

embargo, el origen de estos residuos de tetraciclina sigue siendo un misterio (Bassett et al., 1980; Cook et al., 1989).

En el siglo XIX, John Burden Sanderson observó la ausencia de crecimiento bacteriano en cultivos cubiertos con hongos. Joseph Lister descubrió el efecto inhibitorio de ciertas especies de *Penicillium* en cultivos bacterianos. De forma similar, Louis Pasteur advirtió que el crecimiento de ciertas especies bacterianas inhibía el crecimiento de otras. En el año 1889, Jean Paul Vuillemin acuñó el término antibiosis como cualquier relación biológica en la que un organismo vivo elimina otro para asegurar su existencia (Durand et al., 2019). En este punto, el descubrimiento de la asociación entre microorganismo y enfermedad por Robert Koch y Louis Pasteur a finales de siglo XIX supuso un punto de inflexión en la microbiología moderna (Mohr, 2016). Así, los científicos iniciaron una búsqueda continua para desarrollar diferentes tratamientos contra los microorganismos causantes de enfermedades transmisibles.

1.2 Historia de los antimicrobianos

En microbiología se define a un agente quimioterapéutico como un compuesto sintético con propiedades antimicrobianas, mientras que un antibiótico es una sustancia producida por un organismo vivo que inhibe selectivamente el crecimiento de microorganismos.

El inicio de la era de los antimicrobianos empieza con Paul Ehrlich y la quimioterapia. Ehrlich advirtió que ciertas tinciones eran efectivas únicamente sobre ciertos tipos de microorganismos y llegó a la conclusión de que era posible utilizar ciertos compuestos químicos específicos para tratar una enfermedad producida por un microorganismo sin causar daño al hospedador (Ellis, 2016). A principios de siglo XX, la gonorrea y la sífilis se trataban con arsénico, bismuto o

mercurio (Gould, 2016); se utilizaba sulfato de sodio para el tratamiento de la disentería bacilar y era frecuente la administración de ácido láctico, láudano y cloruro de mercurio contra el cólera (Erdem et al., 2011). Sin embargo, aunque el uso de estos tratamientos experimentales en ocasiones mejoraba los síntomas, la administración y los efectos secundarios a menudo resultaban ser más graves que la enfermedad. De este modo, Ehrlich inició en 1904 un programa de búsqueda de compuestos contra la sífilis mediante la síntesis de múltiples derivados del arsénico. En 1909 el compuesto 606, al que llamó Salvarsán, resultó ser efectivo en ratones y en 1911 se confirmó su eficacia en estudios clínicos con humanos (Aminov, 2010; Ellis, 2016).

Debido al éxito que obtuvo Ehrlich, el científico alemán Gerhard Domagk llevó a cabo un programa similar orientado a la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos a partir de colorantes que conllevó al descubrimiento de las sulfamidas. En el año 1932, el colorante rojo sulfonamidocrisoidina demostró ser altamente efectivo contra *Streptococcus* en ratones y fue comercializado con el nombre de Prontosil (Figura 1.1). El Prontosil se comercializó desde mediados de los años treinta y contribuyó drásticamente a disminuir las muertes por neumonía, fiebre infantil y meningitis (Aminov, 2010; Mohr, 2016). En 1935, se descubrió que este compuesto es metabolizado a sulfanilamida y un colorante, siendo este último innecesario para el efecto bactericida del Prontosil, de modo que las grandes compañías farmacéuticas de la época se dedicaron a sintetizar derivados de las sulfamidas (Gould, 2016).

En los años treinta, por tanto, estaba claramente normalizado el uso de agentes quimioterapéuticos contra microorganismos patógenos. Sin embargo, existe cierta controversia con respecto al momento en el que realmente se inició la era de los antibióticos. Como se ha indicado anteriormente, aunque durante el siglo XIX se reportan diferentes casos de antagonismos entre microorganismos no se llegó a purificar ninguna de las moléculas responsables hasta el año 1893. El científico italiano Bartolomeo Gosio aisló y cultivó un hongo del maíz, *Penicillium brevicompactum*, del que obtuvo un filtrado con propiedades antibióticas contra

Bacillus anthracis. Este descubrimiento y su posible aplicación cayó en el olvido hasta 1912 en que dos científicos americanos, Carl Alsberg y Otis Fisher, sintetizaron el agente activo del filtrado y lo llamaron ácido micofenólico (Bentley, 2001; Kitchin et al., 1997). Asimismo, el primer antibiótico usado para tratar infecciones humanas fue la piocianasa, aislada de *Pseudomonas aeruginosa* por los científicos Rudolf Emmerich y Oscar Löw (Emmerich and Löw, 1899). En estos experimentos se administraba el sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa*, pero los resultados no fueron claros y la preparación resultó ser tóxica, de forma que el tratamiento fue finalmente abandonado (Aminov, 2010). No obstante, una parte muy importante de la comunidad microbiológica considera que la era de los antibióticos se inicia con el descubrimiento de la penicilina en 1928 por el científico escocés Alexander Fleming (Figura 1.1) (Fleming, 1929). Fleming advirtió lisis en colonias de *Staphylococcus* crecidas en placas contaminadas con *Penicillium notatum* y observó que los filtrados de este hongo presentaban efecto antibiótico. Sin embargo, no fue capaz de producir cantidades suficientes del antibiótico ni de elucidar su estructura (Mohr, 2016). Esta tarea fue llevada a cabo por los científicos Howard Florey y Ernest Chain quienes consiguieron obtener penicilina suficiente para realizar ensayos clínicos y para su distribución en 1945 (Chain et al., 1993).

Independientemente, Fleming revolucionó la búsqueda de antibióticos mediante un nuevo método que consistía en sembrar muestras de suelo en placas de agar inoculadas con bacterias patógenas y la subsecuente observación de halos de inhibición. Este procedimiento resultó mucho más rápido y barato que el uso de modelos animales, de modo que tuvo una gran acogida tanto en la industria como en el mundo académico para encontrar microorganismos productores de antibióticos (Aminov, 2010). El período comprendido entre las décadas de los cincuenta y los setenta del siglo XX es considerada la Edad de Oro del descubrimiento de nuevos antibióticos, y no se han descubierto nuevas clases desde entonces (véase apartado 1.4). Este hecho ha propiciado que el enfoque principal para el desarrollo de nuevos antibióticos para combatir la resistencia

emergente sea la modificación química de los antibióticos ya existentes (Chopra et al., 2002).

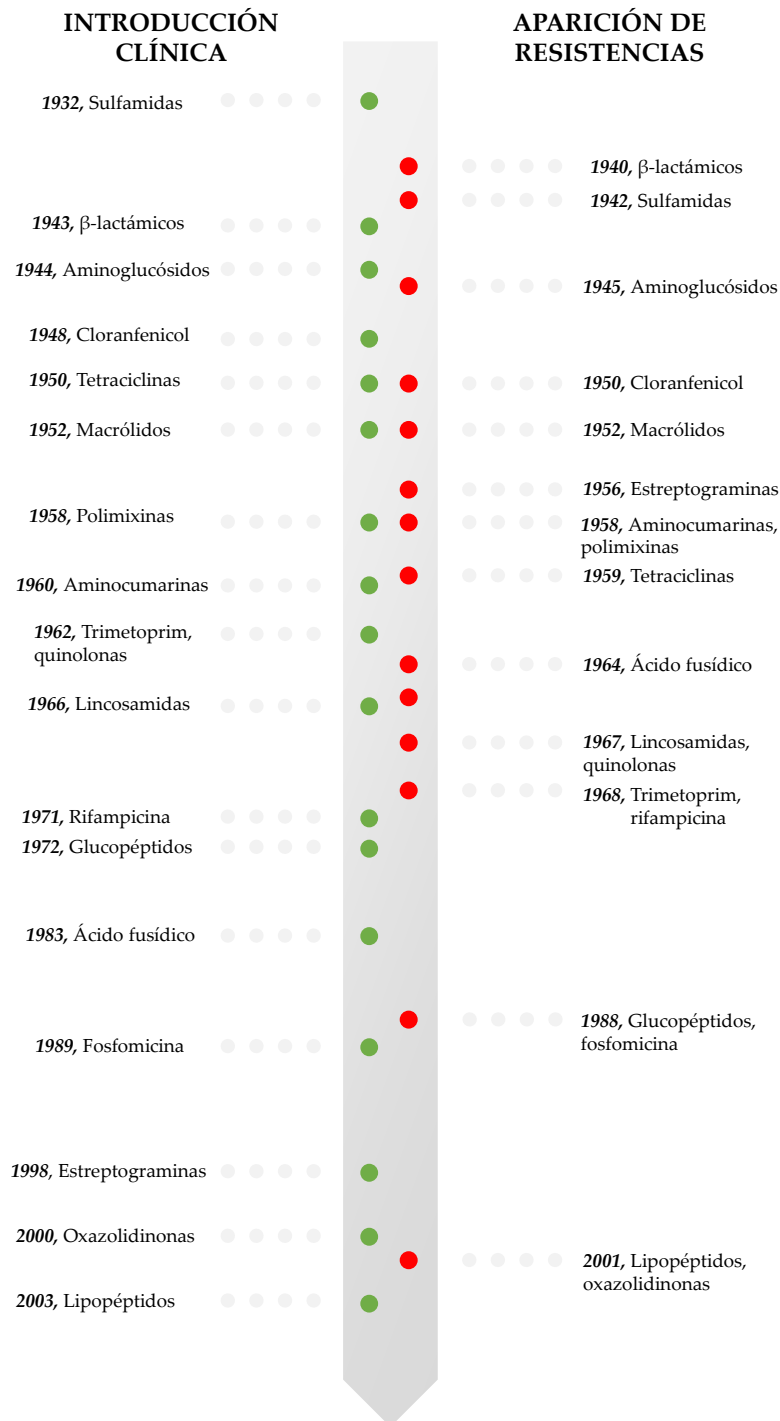


Figura 1.1. Cronología que representa la aprobación del uso clínico de los antibacterianos y la identificación de cepas resistentes a estos compuestos. El color verde indica el año de introducción clínica y el color rojo indica el año de aparición de resistencias. Adaptado de (Ventola, 2015).

1.3 Estrategias de resistencia a los agentes antibacterianos

El desarrollo de los antibacterianos está considerado como uno de los grandes avances de la medicina moderna ya que permite el tratamiento efectivo de las infecciones causadas por bacterias patógenas. Sin embargo, y desde su descubrimiento, estos compuestos han ido perdiendo eficacia debido a la emergencia y diseminación de resistencias entre patógenos. En este sentido, el número de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes va en aumento a nivel global, haciendo intratables algunas de ellas (Khan et al., 2018). De hecho, la OMS (**O**rganización **M**undial de la **S**alud) ha calificado la resistencia a los antibacterianos como una de las tres amenazas de salud públicas más importantes del siglo XXI (Figura 1.2) (World Health Organization, 2014).

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a ciertos antibacterianos, pero también pueden adquirir resistencia mediante mutaciones en genes cromosómicos y mediante la transferencia horizontal de genes de resistencia.

La resistencia intrínseca de una especie bacteriana a un antibacteriano en particular es la capacidad de resistir la acción de ese fármaco como resultado de características estructurales o funcionales inherentes a la bacteria. Un claro ejemplo es el de las bacterias del género *Mycoplasma* que son resistentes a los β -lactámicos puesto que carecen de peptidoglicano en su envuelta celular (Blair et al., 2015).

El desarrollo de resistencia a antibacterianos está relacionado con el sobreuso de estos fármacos (Berglund, 2015). La plasticidad genética bacteriana permite la respuesta de las bacterias a un amplio rango de amenazas ambientales, incluyendo los compuestos antibacterianos. Además del entorno clínico, la producción animal, la agricultura, la acuicultura, los efluentes de industrias farmacéuticas, así como los sistemas municipales de aguas residuales se

consideran los puntos críticos para la aparición de resistencia a los antibacterianos (Saima et al., 2020). Estos entornos se caracterizan por una elevada carga bacteriana, en donde la constante exposición a concentraciones sub-inhedorias de diferentes antibacterianos promueve la aparición y diseminación de bacterias y genes resistentes a éstos (Baym et al., 2016). En esta línea, las bacterias poseen principalmente dos estrategias para paliar la amenaza de estos agentes: (i) mutaciones en genes normalmente asociados al mecanismo de acción del fármaco y (ii) la adquisición a través de la transferencia horizontal de genes de material genético externo que codifique genes que confieran resistencia a los antibacterianos (van Hoek et al., 2011).

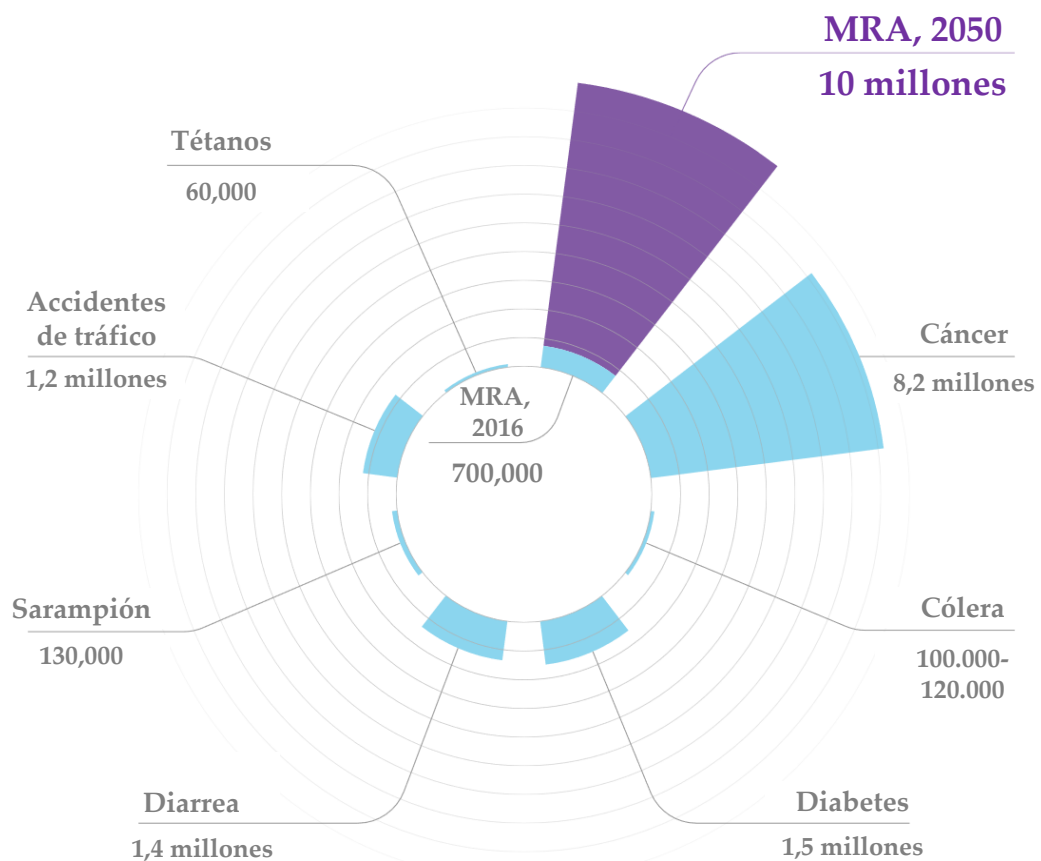


Figura 1.2. Estimación de la OMS sobre las muertes atribuibles a infecciones causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos (MRA) hasta el año 2050 (representado en lila) en comparación con las principales causas de mortalidad en 2016 (representado en azul). Modificada de (O'Neill, 2016).

En una población bacteriana susceptible a un determinado antibacteriano se pueden producir durante la replicación del DNA ciertas mutaciones en genes que afecten a la actividad del compuesto; de este modo la subpoblación resistente sobrevive a la presencia del antibacteriano, eliminándose la parte de la población susceptible. Generalmente, estas mutaciones originan resistencia mediante modificaciones en la diana del fármaco; o a través de una desregulación de determinadas redes regulatorias que causan, por ejemplo, una disminución de la penetrabilidad (por una disminución de expresión de porinas en gramnegativos) (Grossman, 2016), o bien un aumento de la expulsión del antibacteriano (por un aumento de la expresión de bombas de expulsión) (Hooper and Jacoby, 2015). Algunas de estas mutaciones suponen una disminución de la *fitness* celular y únicamente se mantienen cuando existe selección por el compuesto antibacteriano (Munita and Arias, 2016). No obstante, se han descrito múltiples mutaciones compensatorias que tienden a fijar estas mutaciones incluso en ausencia de estos agentes (Moura de Sousa et al., 2017).

Las bacterias clásicamente incorporan DNA externo a través de las siguientes estrategias: transformación (adquisición de DNA directamente del medio), transducción (adquisición de DNA mediada por bacteriófagos), conjugación (adquisición de DNA mediada por contacto célula-célula) y fusión de las células con vesículas de membrana (Domingues and Nielsen, 2017; Thomas and Nielsen, 2005). No obstante, en el ambiente clínico la resistencia es normalmente debida a la conjugación, que ha demostrado ser un método altamente eficiente de transferencia de genes en el tracto gastrointestinal de pacientes bajo tratamiento antibacteriano (Khan et al., 2018). Como regla general, este tipo de transferencia utiliza elementos genéticos móviles como vehículos para difundir información genética. Los elementos genéticos móviles más relevantes son los plásmidos, transposones, integrones y los ICE (*Integrative Conjugative Elements*). Todos ellos juegan un papel crucial en el desarrollo y difusión de resistencia a los antibacterianos entre bacterias nosocomiales (Munita and Arias, 2016). En general, los genes que se encuentran en elementos genéticos móviles y que confieren

resistencia están relacionados con alguno de los siguientes procesos (Figura 1.3) (Khan et al., 2018; Munita and Arias, 2016; Reis et al., 2020; van Hoek et al., 2011; Wright, 2007):

- i. Modificación o inactivación del antibacteriano, dificultando la unión entre éste y su diana.
- ii. Disminución de la disponibilidad intracelular del antibacteriano, ya sea mediante una reducción en la entrada o un aumento en el flujo de salida de la molécula antimicrobiana.
- iii. Protección de la diana mediante modificaciones que determinen una disminución de la afinidad por el antibacteriano o incluso por sobreexpresión de ésta.
- iv. Biodegradación del antibacteriano.
- v. Uso de rutas metabólicas alternativas.

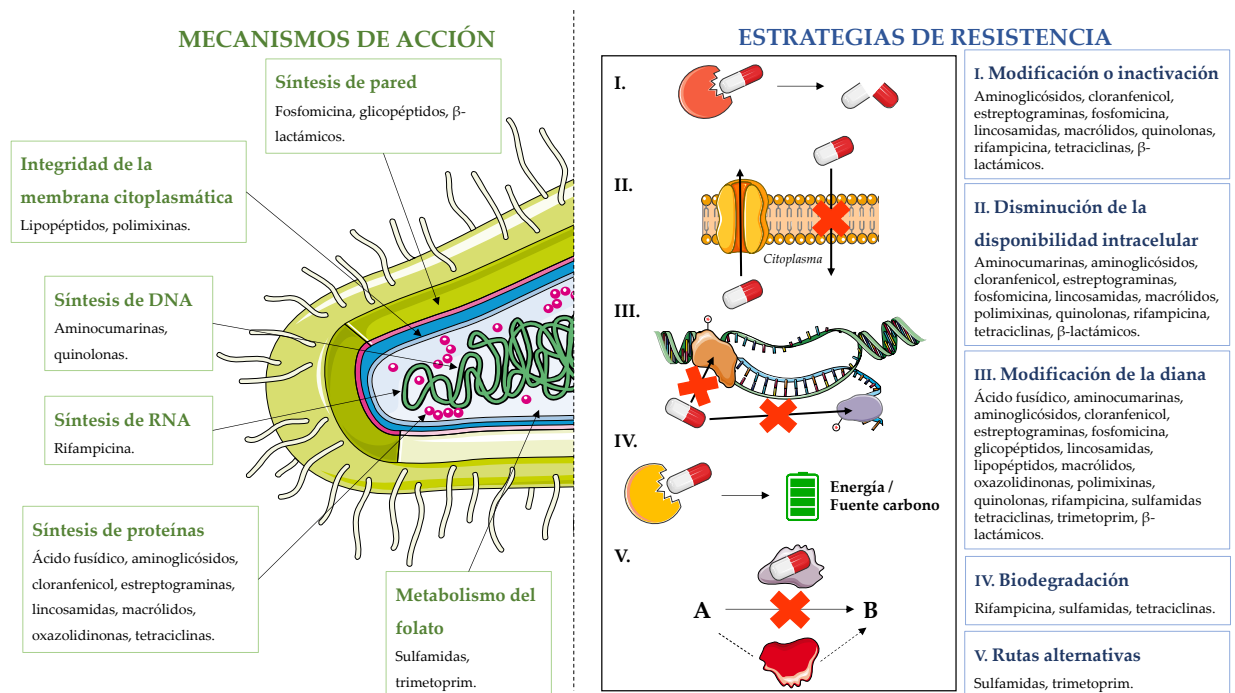


Figura 1.3. Mecanismos de acción (izquierda) de los principales compuestos antibacterianos y estrategias de resistencia adoptadas por las células bacterianas (derecha) contra estos compuestos.

1.4 Mecanismos moleculares de resistencia a las diferentes familias de antibacterianos

1.4.1 Inhibición de la síntesis de pared celular

i) Fosfomicina

La fosfomicina (Figura 1.4) (CAS 23155-02-4), descubierta en el año 1969, es un análogo del fosfoenolpiruvato producido por bacterias del género *Streptomyces* (Hendlin et al., 1969) y que actúa como inhibidor de la enzima MurA. MurA cataliza la reacción entre UDP-N-acetilglucosamina y fosfoenolpiruvato, considerada la reacción de inicio de la síntesis de peptidoglicano y, de este modo, su inhibición tiene un efecto bactericida ya que comporta la pérdida de integridad de la pared, lisis y, finalmente, muerte celular (Silver, 2017). La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro debido a que ha demostrado ser efectiva contra bacterias tanto gramnegativas como grampositivas (Falagas et al., 2016).

En cuanto a los mecanismos que producen resistencia a fosfomicina se destacan los relacionados con la disminución de la disponibilidad intracelular del antibiótico, la modificación de la diana y, finalmente, la inactivación del antibiótico.

La entrada de fosfomicina al citoplasma celular se produce gracias a los sistemas de transportadores de membrana GlpT y UhpT, que están positivamente regulados por cAMP (Kahan et al., 1974). Se han descrito numerosas mutaciones en los genes *glpT* y *uhpT* que generan resistencia a fosfomicina y, de igual forma, mutaciones en los genes *cyaA* y *ptsI* que reducen los niveles intracelulares de cAMP y, por ende, disminuyen la expresión de *glpT* y *uphT* (Cattoir et al., 2007).

En segundo lugar y, normalmente aislados en el laboratorio, se han obtenido mutantes del gen *murA* que confieren resistencia a fosfomicina, ya sea

por disminución de afinidad por la fosfomicina o por un aumento de su expresión (Couce et al., 2012; Takahata et al., 2010).

Finalmente, existen diversas enzimas codificadas en plásmidos que modifican la fosfomicina. Principalmente, este tipo de resistencia está mediada por glutatión S-transferasas codificadas por los genes *fosA* y *fosL1* en el grupo de la familia *Enterobacteriaceae* (Kieffer et al., 2020; Suárez and Mendoza, 1991), *fosB* en grampositivos (Zilhao and Courvalin, 1990) y, por último, *fosX* en *Listeria* (Fillgrove et al., 2007). Adicionalmente, las quinasas FomA (en la que se incluye FosC de *Pseudomonas*) y FomB también han demostrado estar relacionados con la resistencia a fosfomicina (García et al., 1995; Kuzuyama et al., 1996).

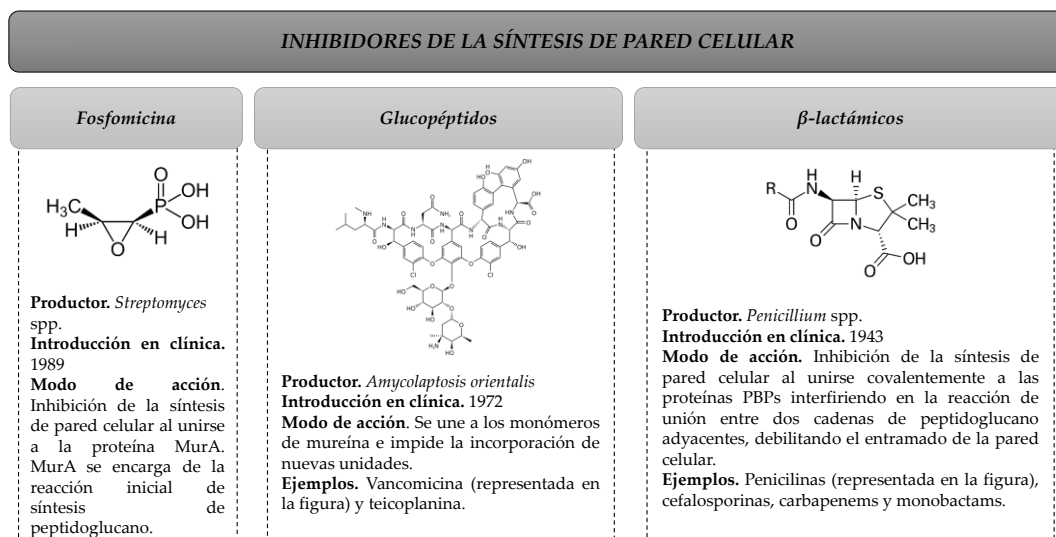


Figura 1.4. Resumen gráfico de los principales compuestos antibacterianos que actúan como inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana.

ii) Glicopéptidos

El primer glicopéptido (Figura 1.4) introducido en el entorno clínico fue la vancomicina (CAS 1404-90-6), producida por la bacteria grampositiva *Amycolaptosis orientalis* (McCormick et al., 1955). Estructuralmente son compuestos proteicos cíclicos con un núcleo formado por siete aminoácidos unidos a dos azúcares (Henson et al., 2015). Los glicopéptidos tienen un mecanismo de acción ciertamente inusual ya que se unen a un sustrato y no a una enzima como la

mayoría de antibióticos. Estos antibióticos inhiben la síntesis de pared celular formando un complejo estable con la región C-terminal D-Ala-D-Ala de los monómeros de mureína impidiendo la incorporación de nuevas unidades a la molécula de peptidoglicano naciente (Reynolds, 1989). El espectro antibacteriano de los glicopéptidos se reduce a los grampositivos ya que sus características físico-químicas impiden el tránsito a través de la membrana externa de los gramnegativos (Zeng et al., 2016).

La resistencia a glicopéptidos, descrita a finales de los años ochenta, está mediada por la producción de monómeros de mureína modificados en el extremo C-terminal, en los que se sustituye la terminación habitual D-Ala-D-Ala por la terminación D-Ala-D-Lac (cuya síntesis es llevada a cabo por las proteínas VanA, VanB, VanC, VanD o VanM) o bien por D-Ala-D-Ser (en este caso se sintetiza mediante las proteínas VanC, VanE, VanG, VanL y VanN) a los que los glicopéptidos se unen con baja afinidad (Binda et al., 2014; Bugg et al., 1991; van Hoek et al., 2011). Los operones que continen los genes *vanA* y *vanB* son los más relevantes en clínica (Eliopoulos and Gold, 2001) y además de codificar los genes responsables de la síntesis de monómeros de mureína modificados, codifican los genes responsables de la eliminación de los monómeros salvajes (Courvalin, 2006).

Adicionalmente, se ha relacionado recientemente la resistencia a glicopéptidos por mutaciones en el factor sigma de la RNA polimerasa (*sigA*) en *Bacillus* (Lee and Helmann, 2014). En *Staphylococcus*, la resistencia a vancomicina se asoció también a mutaciones en la fosfatasa PP2C (Passalacqua et al., 2012), a una combinación de mutaciones en los genes *stp1* (que codifica una serina-treonina fosfatasa) e *yjbH* (que codifica un represor de respuesta a estrés) (Renzoni et al., 2011), y finalmente a mutaciones en el regulador *graR* que interviene en la regulación del grosor de la pared celular (Neoh et al., 2008).

iii) β -Lactámicos

Como ya se ha mencionado previamente, el primer antibiótico en ser descubierto fue un β -lactámico, la penicilina (Figura 1.4) (CAS 1406-05-9). Alexander Fleming advirtió en 1928 la producción por parte de *Penicillium notatum* de una sustancia con propiedades antibacterianas (Fleming, 1929). Por definición, los antibióticos β -lactámicos están formados por un núcleo constituido por un anillo β -lactámico al que se le unen diferentes grupos químicos. Durante los últimos 30 años se han obtenido múltiples antibióticos de esta familia, en la que se incluyen las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactámicos (van Hoek et al., 2011). Los β -lactámicos inhiben la síntesis de pared celular al unirse covalentemente a las PBPs (*penicillin-binding proteins*) interfiriendo en la reacción de unión entre dos cadenas de peptidoglicano adyacentes, debilitando la pared celular y provocando así la muerte celular por shock osmótico (Kotra and Mobashery, 1999). Los β -lactámicos son unos de los antibióticos más utilizados debido a su seguridad y rango de actividad ya que son efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por patógenos tanto gramnegativos como grampositivos (Kotra and Mobashery, 1999).

Como consecuencia del frecuente uso de los β -lactámicos en medicina, la resistencia a este tipo de antibióticos es muy prevalente. A pesar de que el mecanismo de resistencia más común consiste en la inactivación del antibiótico mediante β -lactamasas codificadas en elementos genéticos móviles, también se han identificado mutantes resistentes debido a que presentan versiones alteradas de las PBPs.

Las β -lactamasas son enzimas que catalizan la hidrólisis del anillo β -lactámico, inactivando el antibiótico e impidiendo su unión con las PBPs (Bush and Bradford, 2019). La primera β -lactamasa se identificó en la década de los cuarenta en una cepa de *Staphylococcus* resistente a la penicilina, curiosamente antes de la introducción de la penicilina en clínica (Kirby, 1944). Una vez iniciado el uso de los β -lactámicos en medicina, se empezaron a aislar microorganismos resistentes

por β -lactamasas, codificadas tanto a nivel cromosómico como a nivel plasmídico. Actualmente se han descrito más de 2.700 β -lactamasas (Bush, 2018).

Existen dos tipos principales de β -lactamasas. Por un lado, se encuentran las serina β -lactamasas en cuyo centro catalítico tienen un residuo serina reactivo y, por otro lado, las metalo- β -lactamasas que requieren zinc como cofactor para su actividad catalítica (Bush and Bradford, 2019). Actualmente se utilizan dos tipologías de clasificación para las β -lactamasas. Una de ellas, la clasificación de Ambler, agrupa las β -lactamasas según su secuencia aminoacídica en las clases A, C, D (serina β -lactamasas) y B (metalo- β -lactamasas) (Ambler, 1980). De este modo, las familias de β -lactamasas más importantes se clasifican de la siguiente manera: las β -lactamasas TEM, SHV, CTX-M y KPC (clase A); las β -lactamasas NDM y VIM (clase B); las β -lactamasas CMY y ADC (clase C). Finalmente, las β -lactamasas de clase D se denominan oxacilinasas (OXA) (Tooke et al., 2019).

Por otro lado, la clasificación de Bush–Jacoby–Medeiros clasifica funcionalmente las β -lactamasas según sus perfiles de hidrólisis de sustrato y su respuesta a varios inhibidores (grupos 1, 2 y 3) (Bush et al., 1995). Así, las β -lactamasas de los grupos 2a, 2b, 2be, 2br, 2c y 2f se corresponden con las de clase A de Ambler; las β -lactamasas del grupo 1 con las de la clase C; las del grupo 2d con las de la clase D; y finalmente, las metalo- β -lactamasas del grupo 3 con las de clase B (Bush and Bradford, 2019). De entre todas ellas, las β -lactamasas de clase A (en concreto las correspondientes al grupo 2b), como son las β -lactamasas TEM-1 y SHV-1, son las más ampliamente distribuidas en clínica ya que hidrolizan las primeras penicilinas y cefalosporinas aprobadas en medicina (Bush and Bradford, 2019). Asimismo, destaca la diseminación de las β -lactamasas CTX-M, clasificadas en la clase A y en el grupo 2be, puesto que se tratan de las β -lactamasas de espectro extendido más prevalentes (Lahlaoui et al., 2014).

Aunque de forma menos frecuente, la resistencia a β -lactámicos puede ser debida a mutaciones en las PBP. De este modo, los β -lactámicos no pueden unirse de forma efectiva y, por ende, los antibióticos son menos efectivos en la inhibición de la síntesis de pared (Katayama et al., 2004).

Finalmente, se ha descrito la importancia de ciertas bombas de expulsión en la resistencia a β -lactámicos. De los casos más estudiados, se ha demostrado la importancia de mutaciones que generan la sobreexpresión de diferentes bombas de expulsión de la superfamilia RND (*Resistance Nodulation Division*) como MexAB-OprM en *P. aeruginosa*, AcrAB-TolC en *E. coli* o AdeABC en *Acinetobacter* (Khan et al., 2018; Wilke et al., 2005).

1.4.2 Disrupción de la integridad de la membrana citoplasmática

i) Lipopéptidos

Los lipopéptidos (Figura 1.5) son una clase de antibacterianos cíclicos desarrollados durante los años ochenta. El más conocido es la daptomicina (CAS 103060-53-3), producida por *Streptomyces roseosporus* y descubierta en el año 1985 (Eliopoulos et al., 1985), que presenta un potente efecto bactericida contra bacterias grampositivas, pero no frente gramnegativas (Tran et al., 2015). La daptomicina es un lipopéptido formado por un núcleo cíclico de 13 aminoácidos unido a un ácido graso lipofílico que se inserta en la membrana citoplasmática gracias a los fosfolípidos presentes en ella. Esta interacción es dependiente de Ca^{2+} y causa la despolarización de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático y, por tanto, la muerte celular (Gray and Wenzel, 2020).

Los mecanismos que generalmente originan resistencia a la daptomicina consisten en la modificación de la diana. En concreto, la resistencia a daptomicina más común está mediada por el gen *mprF*, que se encarga de añadir una lisina a los fosfolípidos. La lisina es un aminoácido cargado positivamente y, por tanto, genera un aumento de este tipo de carga en la envuelta celular inhibiendo la interacción de Ca^{2+} y, por ende, de la daptomicina.

Se han descrito numerosas mutaciones “*gain of function*” en el gen *mprF* que determinan un incremento en la síntesis y expresión de fosfolípidos cargados positivamente y, por tanto, relacionadas con resistencia a daptomicina (Ernst and Peschel, 2019). En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión del operón *dlt* tiene un efecto similar puesto que aumenta la carga global de la membrana facilitando la unión de alanina a los ácidos teicoicos de la pared celular (Mechler et al., 2016).

Otro mecanismo asociado a la resistencia a daptomicina consiste en alteraciones en la composición de la membrana citoplasmática (por ejemplo, se han observado mutaciones en los genes *pgsA* y *cls2*) (Peleg et al., 2012). Asimismo, se han descrito mutaciones en diversos sistemas de dos componentes (VraSR, YycFG y LiaFSR) que afectan la expresión génica en presencia de daptomicina produciendo cambios en la fluidez de membrana (Khan et al., 2018). Adicionalmente, la resistencia a daptomicina se ha asociado recientemente con mutaciones en la fosfatasa PP2C (Passalacqua et al., 2012) así como con mutaciones en el regulador *graR* que interviene en el control del grosor de la pared celular (Neoh et al., 2008).

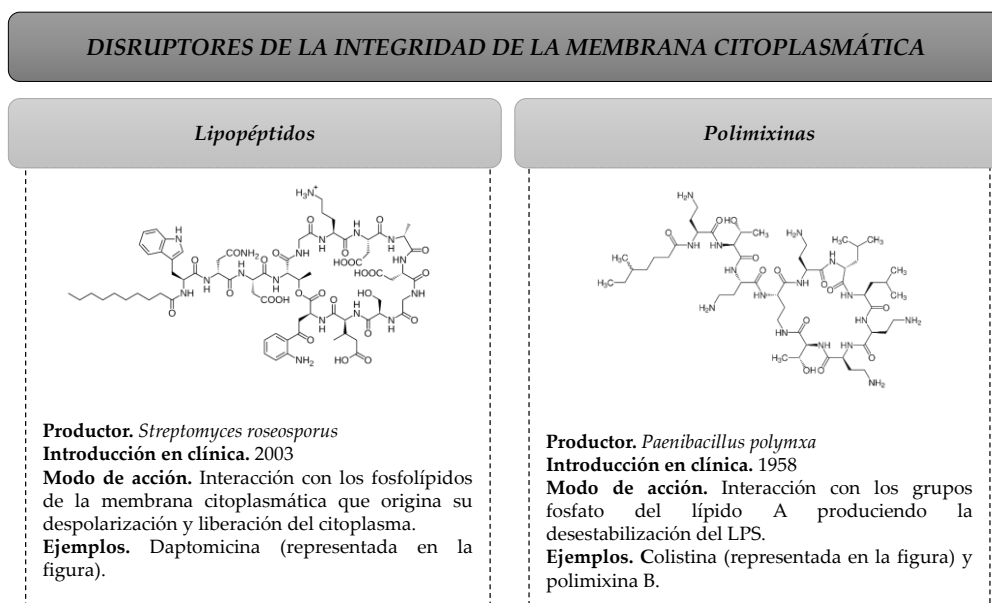


Figura 1.5. Resumen gráfico de los principales compuestos antibacterianos que actúan como disruptores de la integridad de la membrana citoplasmática bacteriana

ii) Polimixinas

Las polimixinas (Figura 1.5) fueron aisladas por primera vez en el año 1947 de cultivos de *Paenibacillus polymxa* (Stansly et al., 1947) y, hasta el momento, se han descrito unas quince variantes de entre las que destacan la polimixina B (CAS 1405-20-5) y la polimixina E, también llamada colistina (CAS 1264-72-8) (Baron et al., 2016). Las polimixinas son péptidos no ribosomales catiónicos caracterizados por un anillo peptídico unido a un ácido graso hidrofóbico, variando la polimixina E y la colistina en un único aminoácido del anillo (Trimble et al., 2016). Esta familia de antibióticos presenta selectividad para bacterias gramnegativas mediada por la interacción inicial con la membrana externa característica de estos microorganismos. Las polimixinas, cargadas positivamente, interaccionan con los grupos fosfatos del lípido A, cargados negativamente, de modo que los cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) son desplazados de los grupos fosfato. Este proceso conlleva la desestabilización del LPS (lipopolisacárido) que origina un aumento de la permeabilidad celular, liberación del citoplasma y, finalmente, muerte celular (Poirel et al., 2017). Del mismo modo, las polimixinas son capaces de inhibir las enzimas respiratorias NDH-2 en la membrana celular bacteriana (Deris et al., 2014).

La resistencia a polimixinas suele estar ligada a cambios en el LPS o bien a la acción de transportadores y bombas de expulsión.

La mayoría de casos de resistencia aislados involucran la modificación de la estructura del LPS. Estas modificaciones incluyen la unión de 4-amino-L-arabinosa, fosfoetanolamina (Moffatt et al., 2019) o, más raramente, de glucosamina y galactosamina al lípido A (Pelletier et al., 2013). La biosíntesis y unión al lípido A de la 4-amino-L-arabinosa está coordinada por el operón *pmrHFIJKLM* que está regulado por los sistemas de dos componentes PmrAB y PhoPQ (Gunn et al., 1998). Mutaciones en *pmrA*, *pmrB*, *phoP* y *phoQ* activan la expresión de este operón generando resistencia a polimixinas (Macfarlane et al., 2000; Roland et al., 1993). Asimismo, mutaciones en los genes *mgrB* y *mgrR*,

regulador del sistema PhoPQ y sRNA regulado por PhoPQ, también se han relacionado con una disminución de la susceptibilidad a polimixinas (Cannatelli et al., 2013; Moon and Gottesman, 2009). Un caso similar está representado por el operón *ccrAB* en el que, aunque su papel fisiológico no está claro, se han descrito mutaciones que causan un aumento de la expresión del operón *pmrHFIJKLM* y, por ende, un aumento de la resistencia a polimixinas (Wright et al., 2015). Por otra parte, el gen cromosómico *pmrC*, también reprimido por PmrAB, codifica la enzima necesaria para la transferencia de fosfoetanolamina al LPS. Así, se han descrito mutaciones en los genes *pmrAB* que generan resistencia a polimixinas (Arroyo et al., 2011). De este modo, las mutaciones en los genes *pmrAB* comportan un aumento en la producción de 4-amino-L-arabinosa y fosfoetanolamina, ambos responsables de la resistencia a polimixinas.

Además se ha descrito en plásmidos la presencia de 8 variantes de la fosfoetanolamina transferasa *mcr* (*mcr1-8*) que generan resistencia clínica a polimixinas (Wang et al., 2018). De un modo similar, se han identificado mutaciones en los genes *lpxA*, *lpxB*, *lpxC* y *lpxD* que comportan una pérdida del LPS y, por tanto, de la diana de las polimixinas generando resistencia (Bojkovic et al., 2016; Moffatt et al., 2010). Adicionalmente, se han identificado especies bacterianas intrínsecamente resistentes como consecuencia de la producción de cápsula, como ciertas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* o *P. aeruginosa* (Llobet et al., 2008).

Finalmente, se ha demostrado que las bombas de expulsión a menudo tienen un papel importante en la resistencia a la colistina. Se han reportado varias bombas o reguladores de bombas en muchas especies, como las bombas Sap, BrIR, KpnEF, OmpU o los complejos AcrAB-TolC y MrtCDE, entre otras, cuya activación conduce a un aumento de la resistencia a varios antibióticos al mismo tiempo, incluida la colistina (Baron et al., 2016; Moffatt et al., 2019).

1.4.3 Interrupción de la replicación

i) Aminocumarinas

Los antibióticos de la clase aminocumarina (Figura 1.6) se caracterizan por la presencia de la estructura 3-amino-4,7-dihidroxicumarina, exclusiva de este grupo de antibióticos, unida a una molécula del azúcar noviosa (Heide, 2009). Existen principalmente tres aminocumarinas: novobiocina (CAS 303-81-1), clorobiocina (CAS 39868-96-7) y cumermicina A₁ (CAS 4434-05-3), que son producidos por diferentes especies de *Streptomyces* y que actúan como potentes inhibidores de la subunidad β de la DNA girasa, codificada por el gen *gyrB*, ocasionando por tanto el bloqueo de la síntesis del DNA bacteriano. El primer antibiótico descrito de esta familia fue la novobiocina en el año 1951 (Gause, 1955). La clorobiocina y la cumermicina A₁, descritas más tarde, son estructuralmente similares a la novobiocina pero muestran una mejor afinidad por la DNA girasa y además actúan como inhibidores de la DNA topoisomerasa IV, codificada por el gen *parE* (Flatman et al., 2006; Heide, 2009). A nivel práctico muestran una elevada actividad en grampositivos, pero su uso es limitado en gramnegativos como consecuencia de su baja penetración en este tipo de microorganismos (Maxwell y Lawson, 2003).

Hasta el momento, se ha descrito resistencia clínica a las aminocumarinas por mutaciones en el gen diana y por la disminución de la disponibilidad intracelular del antibiótico.

La acumulación de mutaciones puntuales en los genes *gyrB* y *parE* se ha asociado a altos niveles de resistencia clínica a diversas aminocumarinas (Fujimoto-Nakamura et al., 2005). Curiosamente, se ha observado resistencia moderada a novobiocina por mutaciones en el gen *parE*, que codifica la DNA topoisomerasa IV, indicando que podría tratarse también de una diana secundaria para este antibiótico (Fujimoto-Nakamura et al., 2005; Hardy y Cozzarelli, 2003).

De igual modo, se han descrito transportadores de membrana de la superfamilia MFS (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily) (Khan et al., 2018) y bombas de expulsión RND (Munita y Arias, 2016) involucradas en la resistencia por disminución de la disponibilidad intracelular de las aminocumarinas. Una estrategia de especial interés es la de la bomba MexAB-OprM en *Pseudomonas*. La proteína NalD es el represor secundario de la bomba MexAB-OprM, que es el principal sistema que contribuye a la multirresistencia en *Pseudomonas*, habiéndose publicado recientemente que la novobiocina es capaz de unirse a NalD disociándolo así del promotor y promoviendo la expresión de MexAB-OprM (Chen et al., 2016).

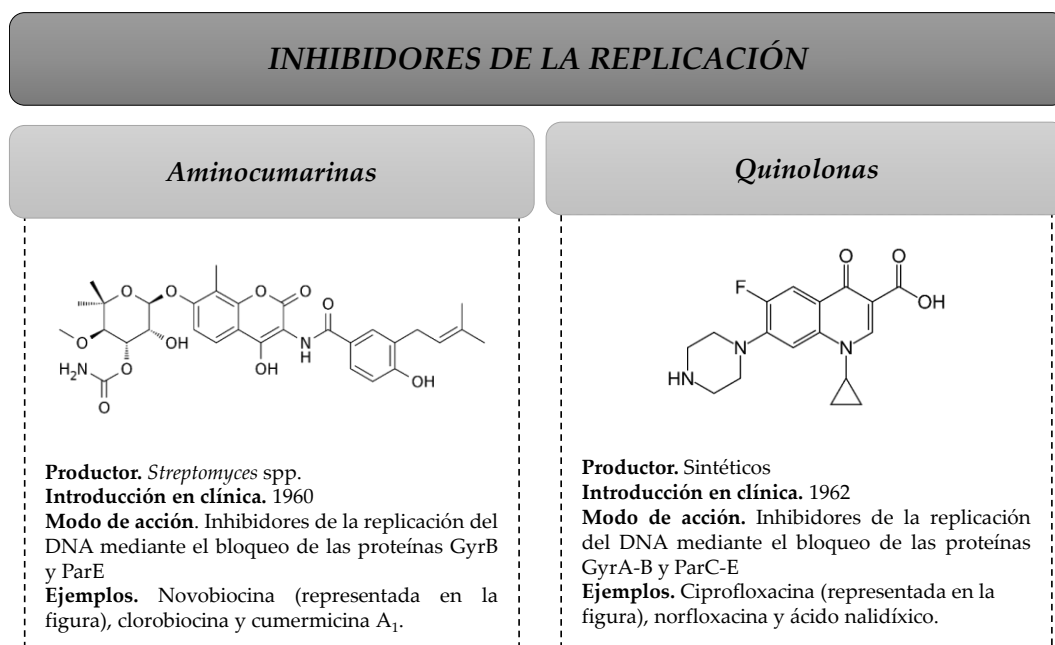


Figura 1.6. Resumen gráfico de los principales compuestos antibacterianos que actúan como inhibidores de la replicación del DNA bacteriano.

ii) Quinolonas

Las quinolonas (Figura 1.6) son un grupo de antibacterianos sintéticos ampliamente utilizados en medicina. El primer miembro de este grupo de antibacterianos, el ácido nalidíxico (CAS 389-08-2), se introdujo en clínica en el año 1962 para tratar infecciones en el tracto urinario (Lesher et al., 1962). La estructura

básica de las quinolonas consiste en un núcleo bicíclico relacionado con la quinina, en el cual se han llevado a cabo diversas modificaciones químicas para generar compuestos con mayor potencia y espectro de actividad, farmacocinética mejorada y menor frecuencia de desarrollo de resistencia (Albrecht, 1977). En este sentido, la introducción de fluorina en la posición seis del anillo conllevó la síntesis de las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina (CAS 85721-33-1) y la norfloxacina (CAS 70458-96-7) que tienen una mayor efectividad (Andersson and MacGowan, 2003). Las dianas moleculares de las quinolonas son la DNA girasa (formada por dos monómeros de GyrA y dos monómeros de GyrB) y la DNA topoisomerasa IV (formada por dos monómeros de ParC y dos monómeros de ParE), que controlan la modulación del superenrollamiento del cromosoma necesario para la síntesis de DNA, para la transcripción y la división celular (Wohlkonig et al., 2010). La unión de las quinolonas a estos complejos bloquea la replicación del DNA y origina así a la muerte celular (Correia et al., 2017). Actualmente, se usan ampliamente para tratar infecciones de bacterias gramnegativas y grampositivas (Hooper and Jacoby, 2015).

Si bien se utilizan de forma extendida en clínica, el uso de quinolonas se ha visto comprometido por la aparición de resistencias. La resistencia a este tipo de antibacterianos principalmente es debido a modificaciones en la diana o en la molécula de la quinolona y a la disminución de la concentración intracelular del antibacteriano.

En la interacción entre la DNA girasa/DNA topoisomerasa IV y las quinolonas, el antibacteriano normalmente se sitúa entre un residuo serina y un residuo ácido (ácido aspártico o ácido glutámico) en una unión coordinada por Mg^{2+} y cuatro moléculas de agua (Wohlkonig et al., 2010). Mutaciones puntuales en la DNA girasa o en la DNA topoisomerasa IV pueden producir resistencia a quinolonas. Típicamente, estas mutaciones se producen en el residuo serina, habiéndose demostrado que estas alteraciones no suponen una disminución de la *fitness* en la ausencia del antibacteriano (Aldred et al., 2014). Estas mutaciones se han localizado principalmente en los genes *gyrA* y *parC*, mientras que con menos

frecuencia en *gyrB* y *parE* (Correia et al., 2017). Para la mayoría de quinolonas de uso médico, la DNA girasa es más sensible en microorganismos gramnegativos, mientras que la DNA topoisomerasa IV es más sensible en grampositivos (Hooper and Jacoby, 2015).

La resistencia clínica asociada a elementos móviles se debe mayoritariamente a los genes *qnr*. Estos genes *qnr* codifican proteínas de la familia “*pentapeptide repeat proteins*” que compiten con las quinolonas para unirse a la DNA girasa o a la DNA topoisomerasa IV. Esta interacción se puede producir con el holoenzima al completo o bien con sus respectivas subunidades de forma individual, protegiendo en cualquier caso el centro activo de la acción de las quinolonas (Tran et al., 2005). La primera variante en descubrirse fue *qnrA* y posteriormente se describieron las familias *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrS* y *qnrVC* (Albornoz et al., 2017; Jacoby et al., 2014). También se ha descrito una variante de la aminoglicósido acetiltransferasa AAC(6′)-Ib-cr que confiere resistencia a las fluoroquinolonas por acetilación (Robicsek et al., 2006).

Debido a que la girasa y la topoisomerasa IV son enzimas citoplasmáticas, las quinolonas deben atravesar la pared bacteriana y, por tanto, la adquisición o expresión diferencial de transportadores de membrana pueden ocasionar resistencia a las quinolonas. Se han descrito hasta el momento tres bombas de expulsión asociadas a plásmidos que generan resistencia a quinolonas: OqxAB, QepA1 y QepA2 (Jacoby et al., 2014; Strahilevitz et al., 2009). De un modo similar, se han asociado mutaciones en bombas de expulsión o bien en sus sistemas de regulación que comportan un aumento de la expulsión de estos antibacterianos a través de la pared de grampositivos. Por ejemplo, se ha descrito la sobreexpresión de las bombas de la superfamilia MFS NorA, NorB y NorC en *Staphylococcus*, PmrA en *Streptococcus*, LmrP en *Lactococcus*; de la superfamilia MATE (Multidrug And Toxic Extrusion) destacan la sobreexpresión de MepA y FepA y, finalmente, Lde, PatAB, SatAB y LmrA de la superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette) (Hooper and Jacoby, 2015). En gramnegativos, se ha demostrado que un aumento de expresión de varias bombas de expulsión, la mayoría en la superfamilia RND,

confieren resistencia a quinolonas. De entre estas bombas destacan AcrAB-TolC, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM; así como el transportador de la superfamilia ABC VcaM en *Vibrio* o el transportador de la familia MFS AbaQ en *Acinetobacter* (Khan et al., 2018; Pérez-Varela et al., 2018). Finalmente, también se ha implicado una disminución o pérdida de expresión de las porinas OmpA, OmpC, OmpD y OmpF en la resistencia a quinolonas (Hooper and Jacoby, 2015).

1.4.4 Inhibición de la transcripción

i) Rifampicina

La rifampicina (Figura 1.7) (CAS 13292-46-1) es un antibiótico semi-sintético obtenido por la modificación química de la rifamicina B, un metabolito natural de *Streptomyces mediterranei*, que se descubrió en el año 1965 (Sensi, 1983). La rifampicina tiene una estructura heterocíclica formada por un núcleo naftoquinona que le confiere su característica coloración rojiza (Tupin et al., 2010). A nivel molecular, se une a la subunidad β de la RNA polimerasa, codificada en el gen *rpoB*, bloqueando la elongación de la cadena de RNA naciente y en consecuencia paraliza la síntesis de proteínas (Campbell et al., 2001). La rifampicina está normalmente indicada en el tratamiento de las infecciones por *Mycobacterium* (Zaw et al., 2018), y ha demostrado ser efectiva contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (Baker et al., 2019; Fily et al., 2019).

Aunque se han descrito especies bacterianas resistentes a rifampicina por inactivación del antibiótico, por expulsión y por biodegradación; la mayoría de cepas resistentes presentan mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa. Principalmente, se ha descrito una región de unos 80 nucleótidos en la que se localizan el 90% de mutaciones responsables de la resistencia a rifampicina (Hughes and Brandis, 2013). Estos polimorfismos en el

gen *rpoB* pueden originar una disminución de la *fitness* así como un cambio en el patrón de expresión (Pérez-Varela et al., 2017). A este respecto, se han identificado en los genes *rpoA* y *rpoC* numerosas mutaciones compensatorias de las acaecidas en el gen *rpoB* (Casali et al., 2014).

A pesar de ser menos frecuente, la resistencia a este antibiótico también se ha asociado con su glicosilación, ADP-ribosilación (*arr*) y fosforilación (*rph*) (Baysarowich et al., 2008; Spanogiannopoulos et al., 2012; Stogios et al., 2016).

Por último, se descubrió un nuevo mecanismo que genera resistencia por biodegradación de la rifampicina en *Nocardia farcinica*. En este proceso está involucrada la enzima rifampicina monooxigenasa, codificada por el gen *rox*, que cataliza la hidroxilación de la rifampicina, que es el primer paso para su degradación (Abdelwahab et al., 2016; Liu et al., 2018).

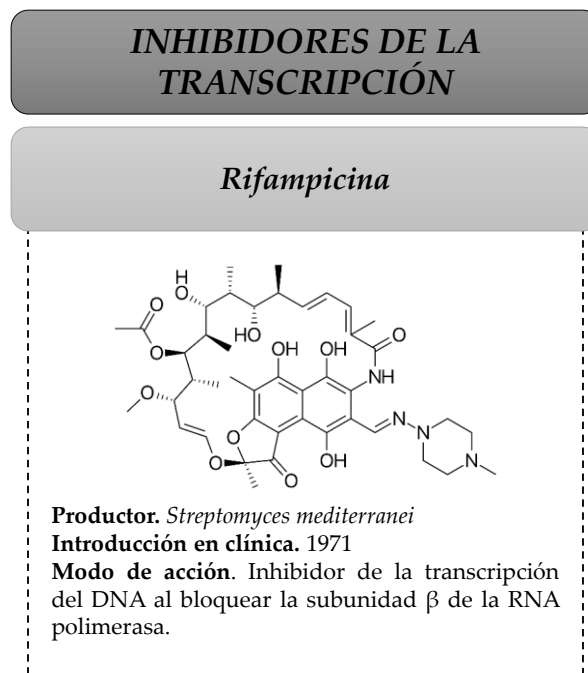


Figura 1.7. Resumen gráfico del principal compuesto antibacteriano que actúa como inhibidor de la transcripción del DNA bacteriano.

1.4.5 Bloqueo de la traducción

i) Ácido fusídico

El ácido fusídico (Figura 1.8) es un antibiótico esteroideo (CAS 6990-06-3), aislado en el año 1962 a partir del hongo *Fusidium coccinium* (Godtfredsen et al., 1962) y que inhibe la síntesis de proteínas (Yamaki, 1965) mediante el bloqueo de EF-G (*elongation factor G*). Este enzima es una GTPasa que cataliza dos pasos esenciales en la síntesis proteica. En primer lugar, se encarga de la translocación del ribosoma permitiendo la unión de un nuevo tRNA al siguiente codón. Y además, participa juntamente con el RRF (*ribosome recycling factor*) en la escisión del complejo ribosoma-proteína naciente-mRNA (Guo et al., 2012). El bloqueo de EF-G por parte del ácido fusídico, por tanto, evita la elongación de la proteína naciente y resulta en una inhibición del crecimiento celular (Curbete y Salgado, 2016). El efecto del ácido fusídico es bacteriostático aunque se ha descrito que puede tener efecto bactericida a altas concentraciones (Verbist, 1990). Este antibacteriano es efectivo contra la mayoría de bacterias grampositivas, mientras que la mayoría de gramnegativas son resistentes ya que su elevado tamaño y lipofilicidad dificultan su transporte hacia el interior de estos microorganismos (Fernandes, 2016).

Principalmente, la resistencia bacteriana al ácido fusídico es causada o bien por mutaciones en la diana o bien por la expresión de proteínas que la protegen.

Clásicamente, se ha considerado que el mecanismo principal de resistencia bacteriana al ácido fusídico consiste en mutaciones puntuales en la diana EF-G, codificada en el gen *fusA*. Se han identificado más de 30 mutaciones en dicho gen que generan resistencia al ácido fusídico (Lannergard et al., 2009). Asimismo, se han reportado también mutaciones en la proteína ribosomal L6, codificada por el gen *rplF* (*fusE*), que confieren resistencia moderada al ácido fusídico indicando un posible segundo lugar de unión de este antibiótico al ribosoma (Norström et al., 2007).

Por otro lado, la resistencia puede estar causada por la adquisición de los genes *fusB*, *fusC* y *fusD* contenidos principalmente en plásmidos de *Staphylococcus*. Estos genes codifican proteínas de bajo peso molecular que bloquean la interacción del antibiótico con EF-G proporcionando niveles moderados de resistencia a ácido fusídico. Actualmente en Europa, el tipo de resistencia a ácido fusídico más común está mediado por el producto del gen *fusB* (Fernandes, 2016).

ii) Aminoglicósidos

El primer aminoglicósido (Figura 1.8) aislado fue la estreptomicina (CAS 57-92-1), producida por *Streptomyces griseus* en el año 1944 (Jones et al., 1944). A partir de entonces, se han ido caracterizando nuevos aminoglicósidos sintetizados por diferentes especies de *Streptomyces*, como la neomicina (CAS 119-04-0), la tobramicina (CAS 32986-56-4), la kanamicina (CAS 59-01-8) o la amikacina (CAS 37517-28-5); e incluso de otros géneros bacterianos como *Micromonospora*, bacteria productora de la gentamicina (CAS 1403-66-3) (Becker and Cooper, 2013). Típicamente los aminoglicósidos están formados por aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos (Magnet and Blanchard, 2005). Estos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas uniéndose, con alta afinidad, al sitio A del rRNA 16S de la subunidad 30S del ribosoma. Como resultado de esta interacción, el antibiótico induce errores en la traducción al provocar dificultades en la lectura de los codones del mRNA, dando lugar a proteínas aberrantes y generando finalmente la muerte celular (Krause et al., 2016). Los aminoglicósidos tienen un efecto bactericida y son de amplio espectro, siendo utilizados de forma rutinaria contra bacterias grampositivas y gramnegativas (Serio et al., 2018).

La resistencia a aminoglicósidos puede darse mediante diferentes mecanismos como son la modificación del antibiótico, modificaciones en la subunidad 30S del ribosoma que interfieren con la unión de los aminoglicósidos, o bien por alteraciones en el transporte a través de la membrana.

Los mecanismos generadores de resistencia a aminoglicósidos aislados más frecuentemente en el ambiente clínico están mediados por proteínas que modifican al antibiótico y que están codificadas en elementos genéticos móviles asociados a múltiples resistencias. Estas enzimas están generalmente clasificadas según el tipo de modificación que originan: acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT o AAD) y finalmente fosfotransferasas (APH) (van Hoek et al., 2011). Las enzimas modificadoras de aminoglicósidos más comunes son las acetiltransferasas que se clasifican en cuatro grupos según el grupo amino al que modifican: AAC (1), AAC (3), AAC (2') y AAC (6'); de las que se han descrito decenas de variantes (Serio et al., 2018), siendo AAC(6')-Ib la más común en enterobacterias nosocomiales (Subramanian et al., 2016). La variante AAC(6')-Ib-cr, como ya se ha comentado anteriormente, tiene la capacidad de inactivar también a las fluoroquinolonas (Robicsek et al., 2006). El segundo grupo más amplio son las fosfotransferasas, de las que existen siete tipos: APH (4), APH (6), APH (9), APH (3'), APH (2''), APH (3''), y APH (7''). Las variantes de APH (3') son las más prevalentes en gramnegativos y, concretamente, la variante APH(3')-IIIa en grampositivos (Ramirez and Tolmasky, 2010). Por último, existen cinco tipos de adeniltransferasas: ANT (6), ANT (9), ANT (4'), ANT (2'') y ANT (3''), de las que se han descrito más de diez variantes (Ramirez and Tolmasky, 2010; van Hoek et al., 2011). Un caso especial es el representado por ANT (3')-Ih-AAC (6')-IId, descrito por primera vez en *Serratia* spp., que es una enzima bifuncional que cataliza la acetilación y adenilación de aminoglicósidos (Kim et al., 2006).

Por otra parte, la resistencia a aminoglicósidos también puede ser generada por la transferencia de grupos metilo al rRNA 16S. Las primeras metilasas en ser descritas fueron ArmA en *Citrobacter* y RmtA en *Pseudomonas*, que metilan la posición G1405 del rRNA 16S (Gołebiewski et al., 2007; Yokoyama et al., 2003). A partir de entonces, se han identificado múltiples metilasas asociadas a elementos genéticos móviles que generan resistencia a aminoglicósidos: RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH (metilan la posición G1405 del rRNA 16S) y NpmA (metila la posición A1408 del rRNA 16S). De entre todas ellas, ArmA y RmtB suelen

ser las más frecuentes y se acostumbra a encontrar en la familia *Enterobacteriaceae* (Doi et al., 2016).

Adicionalmente, se han identificado mutaciones en el rRNA 16S, en el gen *rpsL* (codifica la proteína ribosomal S12) así como en el gen *rsmG* (codifica una metilasa del rRNA) que confieren resistencia a estreptomicina. No obstante, las mutaciones en el rRNA 16S son poco frecuentes ya que en su mayoría son letales (Holberger and Hayes, 2009; Nessar et al., 2011).

Por último, la resistencia a aminoglicósidos también puede ser consecuencia de sistemas de expulsión, normalmente de la superfamilia RND en patógenos gramnegativos. Los más comunes son las bombas de expulsión tipo AcrAD-TolC, de las que existen homólogos en patógenos como *Acinetobacter* (AdeABC y AdeDE), *Burkholderia* (AmrAB-OprA y BpeAB-OprB) o *Pseudomonas* (MexXY-OprM) (Garneau-Tsodikova and Labby, 2016). También se han descrito mutaciones en los reguladores de estos sistemas que comportan un aumento de la resistencia a aminoglicósidos por sobreexpresión de bombas. Un ejemplo de ello son las mutaciones en el gen *parR*, regulador de las bombas *mexXY* en *Pseudomonas* (Muller et al., 2011). Asimismo, también se han descrito otras proteínas de membrana de las superfamilias MFS y MATE en *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, respectivamente (Garneau-Tsodikova and Labby, 2016; Khan et al., 2018).

iii) Cloranfenicol

El cloranfenicol (Figura 1.8) (CAS 56-75-7) (inicialmente conocido como cloromicetina) es un antibiótico de amplio espectro, efectivo contra bacterias gramnegativas y grampositivas, que fue aislado en 1947 de *Streptomyces venezuelae* (Ehrlich et al., 1947). La molécula de cloranfenicol es sencilla y consiste en un 1,3-propanediol al que va unido un grupo p-nitrofenil y un sustituyente N-dicloroacetil, siendo la primera molécula natural aislada en contener un grupo nitro y un sustituyente dicloroacetil (Shaw, 1983). El cloranfenicol es altamente específico y actúa como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas, mostrando

un efecto bacteriostático al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma. De esta manera, el cloranfenicol interfiere con la actividad transpeptidasa del ribosoma e impide la elongación de las proteínas nacientes (Roberts and Schwarz, 2016).

La resistencia a cloranfenicol está principalmente mediada por su acetilación. Sin embargo, también se han reportado mecanismos que involucran una disminución de la disponibilidad intracelular del antibiótico, así como modificaciones en la diana.

Existen principalmente dos tipos de cloranfenicol acetilasas (CAT) que se clasifican según su estructura: *catA* (Alton and Vapnek, 1979), de la cual existen 16 variantes, y *catB* (Tennigkeit and Matzura, 1991), que cuenta con 6 variantes (Schwarz et al., 2004). También se han descrito la hidrolasa *estDL136* (Tao et al., 2012) y la nitroreductasa *nfsB* capaces de conferir resistencia al cloranfenicol (Crofts et al., 2019) mediante la hidrólisis o reducción del grupo p-nitrofenil, respectivamente.

Con menor frecuencia se han aislado mutantes resistentes a cloranfenicol por mutaciones en el rRNA 23S (Ma et al., 2014), así como por la metilación del residuo A2053 del rRNA 23S por parte de la metilasa Cfr (Long et al., 2006).

Se han identificado también diferentes transportadores de membrana de la superfamilia MFS como responsables de la resistencia a cloranfenicol: CmrA, Cmx, CmlA, CmlB, CraA, FexA, FexB, FloR y PexA. Entre estos transportadores, CmlA y FloR son los más comunes (Bissonnette et al., 1991; Briggs and Fratamico, 1999; Khan et al., 2018). Finalmente, se han reportado recientemente los transportadores OptrA y PoxTA, de la superfamilia ABC, relacionados con la resistencia a este antibiótico (Antonelli et al., 2018; Roberts and Schwarz, 2016).

iv) Estreptograminas

Las estreptograminas (Figura 1.8) son una familia de antibióticos producidos por diferentes especies de *Streptomyces* (Vazquez, 1966) que se dividen en dos clases según su estructura: las de clase A (macrolactonas poli-insaturadas) y las de clase B (hexadepsipéptidos cíclicos) (Schwarz et al., 2016). Estos antibióticos se unen a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano bloqueando la traducción (Wright, 2007). Individualmente, las estreptograminas tienen un efecto bacteriostático, pero el uso combinado de estreptograminas de clase A y de clase B conlleva un efecto bactericida en *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La unión al ribosoma de las estreptograminas de clase A provoca un cambio conformacional de esta región que aumenta la afinidad de las estreptograminas de clase B por el ribosoma, hecho que explica la sinergia que se observa con la mezcla de ambas tipologías (Johnston et al., 2002). La autorización de la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1999 para utilizar la combinación quinupristina-dalfopristina (CAS 126602-89-9) supuso el primer antibiótico de esta familia en ser usado en clínica (Schwarz et al., 2016). Sin embargo, contra bacterias gramnegativas no son muy efectivas dado que presentan dificultades para penetrar a través de la membrana externa de este tipo de microorganismos (Wright, 2007).

Se han descrito numerosos mecanismos que generan resistencia a estreptograminas que incluyen: la modificación de la diana, la inactivación del antibiótico y la disminución de su disponibilidad intracelular.

La modificación del RNA ribosomal es el mecanismo más común de resistencia a estreptograminas. En el caso de esta familia de antibióticos los genes responsables son los genes *erm* que catalizan la metilación del residuo de adenina que se encuentra en la posición A2058 del dominio V del rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma. Los genes *erm* confieren resistencia adicional a macrólidos y lincosamidas como consecuencia del solapamiento de sus dianas (Leclercq, 2002). Con menor frecuencia se ha relacionado a la metilasa Cfr, que cataliza la metilación del rRNA 23S, con la resistencia a estreptogramina A (Long

et al., 2006). Del mismo modo, se han identificado mutaciones en proteínas ribosomales asociadas a la subunidad 50S del ribosoma (Cattoir et al., 2007) y, en menor medida, mutaciones en el rRNA 23S que confieren resistencia a estreptograminas (Depardieu y Courvalin, 2001).

La inactivación de las estreptograminas de clase A suele ser consecuencia de la actuación de acetiltransferasas mientras que la inactivación de las de clase B se debe a la acción de hidrolasas (Johnston et al., 2002). Principalmente, se han descrito los genes *vatA*, *vatB* y *vatC* en *Staphylococcus* (Allignet et al., 1998, 1993; Allignet and Solh, 1995) y *vatD* y *vatE* en *Enterococcus* (Werner et al., 2000) como responsables de la acetilación de estreptograminas. En el caso de la inactivación de las estreptograminas de clase B, se han descrito hasta ahora en plásmidos de *Staphylococcus* las hidrolasas *vgaA* y *vgaB* (Allignet et al., 1998, 1988).

Finalmente, la resistencia a estos antibióticos también puede ser resultado de transportadores y bombas que disminuyen su concentración intracelular. Los ejemplos que juegan un papel más importante en la resistencia clínica a las estreptograminas son los transportadores ABC Vga (también llamado Lsa en *Enterococcus*) y Msr (Wendlandt et al., 2015).

v) Lincosamidas

Las lincosamidas (Figura 1.8) son una familia de antibióticos que, a pesar de ser estructuralmente diferentes, comparten diana con los macrólidos y la estreptogamina B. Estas tres grandes familias se engloban comúnmente en el grupo MLS_B y en ciertas ocasiones su resistencia suele estar vinculada (Pyörälä et al., 2014). La lincomicina (CAS 154-21-2), primer antibiótico de esta familia, se aisló por primera vez en el año 1962 de una cepa de *Streptomyces lincolnensis* encontrado en muestras de suelo (MacLeod et al., 1964). Estructuralmente las lincosamidas están formadas por la unión de un aminoácido (L-prolina modificada) con un azúcar lincosamina (Kagan and Grostic, 1972). Como ya se ha referido anteriormente, las lincosamidas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas

mediante la inhibición de la actividad transpeptidasa uniéndose a los sitios A y P de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Schlünzen et al., 2001). Esta familia de antibióticos es efectiva únicamente contra bacterias grampositivas (Schwarz et al., 2016).

El patrón de resistencia a lincosamidas es parecido al ya mencionado de las estreptograminas. Básicamente, se encuentran bacterias resistentes a esta familia de antibióticos por modificación de la diana, por inactivación, así como por la disminución de su disponibilidad intracelular.

Igual que sucede con los macrólidos y las estreptograminas, se han aislado cepas resistentes a lincosamidas que contienen los genes *erm*, catalizadores de la metilación del residuo A2058 del rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma (Leclercq, 2002). En la misma línea, se ha demostrado que la metilación del residuo A2053 del rRNA 23S por parte de la metilasa Cfr es otro mecanismo responsable de la resistencia a lincosamidas y a otros antibióticos (Vester, 2018). Con menor frecuencia, también se han relacionado mutaciones en el rRNA 23S así como en proteínas ribosomales asociadas con la resistencia (Prats-van der Ham et al., 2018).

Recurrentemente, las lincosamidas son inactivadas mediante las lincosamida-nucleotidiltransferasas codificadas por los genes *lnu*, de los cuales existen ocho versiones (*lnuA-lnuH*) (Luo et al., 2018; Spížek and Řezanka, 2017). También se genera resistencia por inactivación de las lincosamidas por parte de las adenilasas codificadas por los genes *linA* y *linB* (Bozdogan et al., 1999; Brisson-Noël and Courvalin, 1986).

Asimismo, diferentes transportadores de membrana de la superfamilia MFS en *Corynebacterium* (LmrA y LmrB) (Zhang et al., 1992) y transportadores de membrana de la superfamilia ABC en *Staphylococcus* (LsaA, LsaB, LsaC, VgaE y SalA) se han descrito como causantes de resistencia a lincosamidas (Hawkins et al., 2017; Li et al., 2014; Wendlandt et al., 2015).

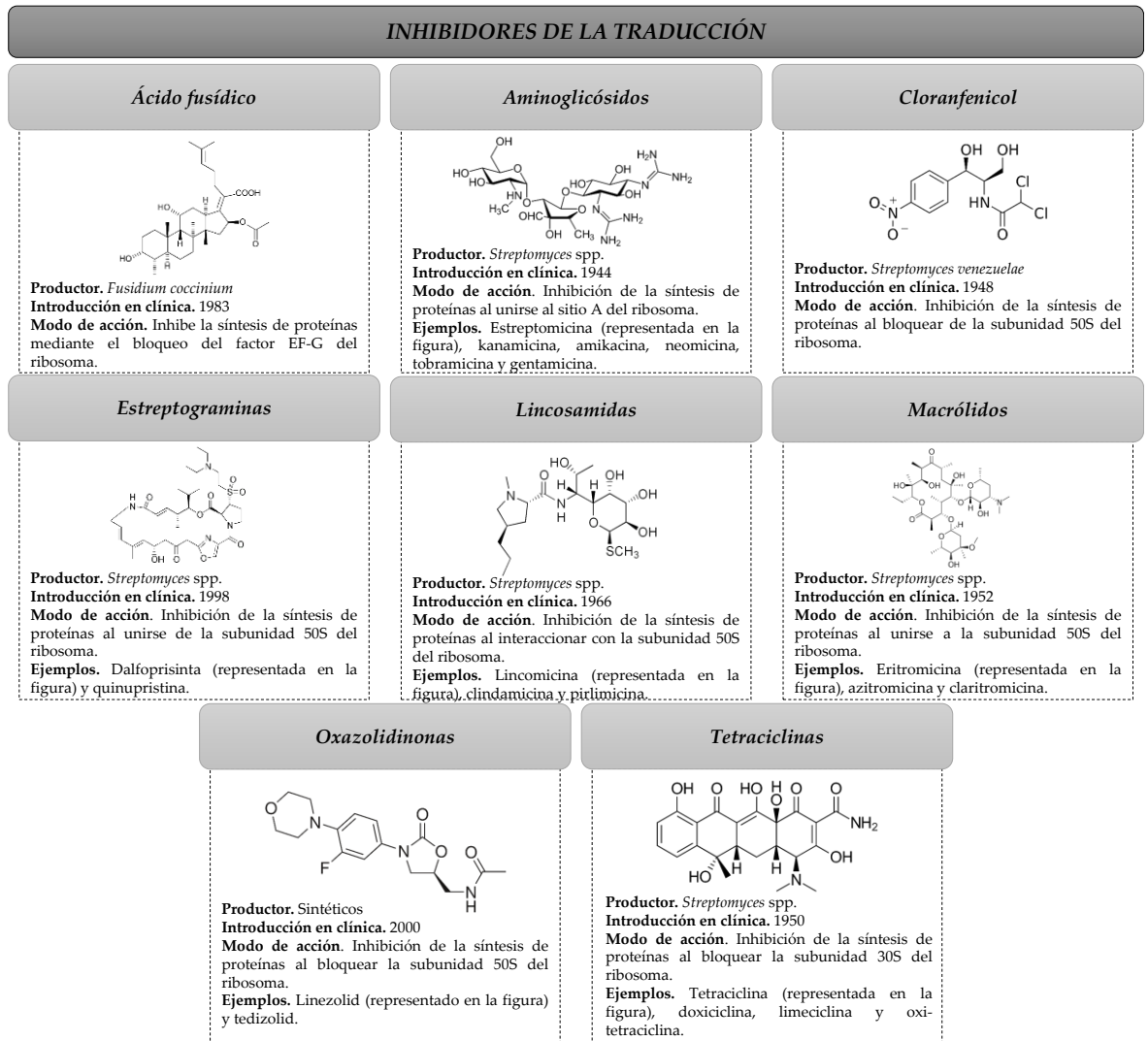


Figura 1.8. Resumen gráfico de los principales compuestos antibacterianos que actúan como inhibidores de la síntesis de proteínas.

vi) Macrólidos

Los macrólidos (Figura 1.8) son complejas moléculas cíclicas formadas por un anillo lactona compuesto por 14, 15 o 16 átomos al cual van unidos diferentes azúcares (Schroeder and Stephens, 2016). El primer miembro de esta familia de antibióticos fue la eritromicina (CAS 114-07-8), producida por *Streptomyces erythraeus*, que se descubrió en 1952 (McGuire et al., 1952). Los macrólidos, que juntamente con las lincosamidas y las estreptograminas B conforman el grupo de

antibióticos MLS_B, se unen a la subunidad 50S del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas (Pyörälä et al., 2014). Concretamente, actúan inhibiendo el proceso de transpeptidación y translocación del ribosoma, causando la escisión prematura de cadenas de polipéptidos incompletas del ribosoma (Giguere, 2006). Sin embargo, se ha publicado recientemente que los macrólidos inhiben selectivamente la traducción de un subconjunto concreto de proteínas celulares y que su acción a este respecto depende fundamentalmente de la secuencia de las proteínas nacientes (Vázquez-Laslop and Mankin, 2018). Son activos principalmente contra grampositivos aunque han demostrado ser eficaces también frente a algunas especies de gramnegativos como *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Shigella* o *Salmonella* (Feßler et al., 2018).

Los mecanismos por los cuales se adquiere resistencia a los macrólidos están determinados principalmente por la modificación de la diana, por inactivación de éste, y por la disminución de la disponibilidad intracelular.

El principal mecanismo con el que se genera resistencia a macrólidos es mediante las metilasas *erm*, codificadas normalmente en elementos genéticos móviles, que se encargan de metilar el rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma, impidiendo así el acceso de los macrólidos (Leclercq, 2002). Aunque de forma menos frecuente, también se ha detectado resistencia a macrólidos por acción de la metilasa Cfr que, como ya se ha mencionado, es responsable de la metilación del residuo A2053 del rRNA 23S (Phillips and Sharaf, 2016).

Adicionalmente, mutaciones puntuales en el rRNA 23S así como en las proteínas ribosomales L4 y L22 originan resistencia a macrólidos (Diner and Hayes, 2009; Franceschi et al., 2004).

La inactivación de los macrólidos puede ser debida a la actuación de las fosfotransferasas *mph* (O'Hara et al., 1989) o de las estererasas *ere* (Morar et al., 2012) codificadas en elementos genéticos móviles, de las cuales se han descrito 15 y 5 variantes, respectivamente (Golkar et al., 2018).

Finalmente, la expulsión de macrólidos mediante transportadores de membrana se lleva a cabo principalmente por los transportadores Mef de la superfamilia MFS. Los genes *mef* están ampliamente distribuidos en grampositivos, aunque también se han descrito en ciertos gramnegativos (Ojo et al., 2004). Curiosamente, los genes *mef* se co-transcriben con el transportador *mel* (también conocido como *msrD*) de la superfamilia ABC y ambas proteínas interactúan sinérgicamente para aumentar la resistencia a macrólidos (Schroeder and Stephens, 2016). De modo similar, se han descrito cuatro tipos de transportadores de la familia Msr asociados a resistencia a macrólidos (Fyfe et al., 2016). Finalmente, se han identificado mutaciones en el gen *adeN*, represor del sistema de bombas AdeIJK en *Acinetobacter*, que aumentan la resistencia de este microorganismo a los macrólidos (Rosenfeld et al., 2012).

vii) Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas (Figura 1.8) representan una clase de antibacterianos sintéticos con elevada actividad contra microorganismos grampositivos, aunque algunos derivados muestran efectividad también en gramnegativos. A nivel químico son compuestos que presentan la estructura 2-oxazolidona (Phillips and Sharaf, 2016). El primero en comercializarse fue el linezolid (CAS 165800-03-3) a finales de los años noventa (Zurenko et al., 1997) y seguidamente se introdujo el tedizolid (CAS 856867-55-5) (Kanafani and Corey, 2012). Las oxazolidinonas inhiben la síntesis de proteínas al unirse al rRNA 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano impidiendo la formación del complejo inicial de Met-tRNA, mRNA y ribosoma (Shah, 2015).

Actualmente, la resistencia a oxazolidinonas es poco común y se limita básicamente a modificaciones en la diana. Por este motivo, en concreto el linezolid, es uno de los antibacterianos reservados para las infecciones bacterianas más graves (Hashemian et al., 2018). A pesar de ello, se han publicado recientemente transportadores que reducen la concentración intracelular de las oxazolidinonas.

El principal mecanismo de resistencia que se ha descrito para esta clase de antibacterianos involucra mutaciones en la región central del dominio V del rRNA 23S así como mutaciones en las proteínas L3 y L4 asociadas a esta subunidad del ribosoma y codificadas en los genes *rplC* y *rplD* (de Almeida et al., 2013; Román et al., 2013; Xiong et al., 2000). Además de estas mutaciones puntuales, la adquisición de la metilasa Cfr ha demostrado ser responsable de un aumento de la resistencia a oxazolidinonas. La metilasa Cfr, como se ha comentado con anterioridad, cataliza la metilación del residuo A2053 del rRNA 23S y reduce la susceptibilidad a un amplio número de antibacterianos que actúan a nivel ribosomal además del linezolid (Candela et al., 2017).

Recientemente, se ha publicado la relación entre los transportadores Optra y PoxA, de la superfamilia ABC, con la resistencia a linezolid en *Enterococcus* y *Staphylococcus* (Antonelli et al., 2018; Wang et al., 2015).

viii) Tetraciclinas

Las tetraciclinas (Figura 1.8) (CAS 60-54-8), descubiertas en el año 1948, son una familia de antibióticos producidos por diferentes especies de *Streptomyces* (Duggar, 1948). Estos compuestos están formados por un núcleo constituido por cuatro anillos de seis carbonos fusionados (denominados A, B, C y D) a los que se unen diferentes grupos funcionales (Chopra and Roberts, 2001). Los anillos A, B y C presentan carbonos saturados mientras que el anillo D es aromático (Thaker et al., 2010). Las tetraciclinas se unen a los ribosomas bacterianos e interaccionan con el rRNA 16S de la subunidad 30S impidiendo la unión del tRNA cargado al sitio A del ribosoma durante la elongación del polipéptido naciente (Grossman, 2016). Se considera que las tetraciclinas son una familia de antibióticos bacteriostáticos y de amplio espectro ya que se usan contra microorganismos gramnegativos y grampositivos (Roberts, 2005).

La resistencia a tetraciclinas es muy común siendo la modificación del ribosoma, la inactivación enzimática de las tetraciclinas, la disminución de la

disponibilidad intracelular y la biodegradación los principales mecanismos que generan resistencia clínica a esta familia de antibacterianos.

Hasta el momento, se han identificado múltiples mutaciones en el rRNA 16S en diferentes géneros bacterianos que reducen la afinidad del ribosoma por las tetraciclinas confiriendo así resistencia contra estos compuestos (Amram et al., 2015; Trieber and Taylor, 2002). Asimismo, también se han identificado mutaciones en las proteínas ribosomales S3 y S10, codificadas por los genes *rpsC* y *rpsJ*, que generan resistencia *in vitro* a tetraciclinas (Lupien et al., 2015). A nivel ribosomal se han reportado recientemente mutaciones en una rRNA 16S metilasa RsmD-like que producen una disminución de la susceptibilidad a tetraciclinas en *Streptococcus* (Lupien et al., 2015). No obstante, el mecanismo más común de resistencia a tetraciclinas consiste en la protección del ribosoma, principalmente, mediante las proteínas Tet, diseminadas ampliamente en elementos genéticos móviles en bacterias tanto gramnegativas como grampositivas (Roberts, 2011). Las proteínas Tet son estructuralmente similares a las ya mencionadas EF-G y, por tanto, se unen de forma similar al ribosoma impidiendo la interacción de este con las moléculas de tetraciclina (Li et al., 2013). Actualmente se han descrito doce genes *tet* diferentes que confieren resistencia por protección ribosomal, entre los que se destacan *tetM* y *tetO* (Roberts and Schwarz, 2016). En esta línea, también ha sido identificada la proteína *otrA* en *Streptomyces* cuyo mecanismo de protección al ribosoma es similar al de las proteínas Tet. (Doyle et al., 1991).

El conjunto de genes responsables de la catálisis de las tetraciclinas es muy limitado. El más estudiado es *tetX* cuyo producto es una monooxigenasa dependiente de flavina que cataliza la hidrólisis inicial de la vía de biodegradación de la tetraciclina (Yang et al., 2004). Sin embargo, se han reportado otros casos menos estudiados como son los genes *tet34* y *tet37*, sin relevancia clínica aparente (Diaz-Torres et al., 2003; Nonaka and Suzuki, 2002).

Las bombas de expulsión más comunes para las tetraciclinas, aunque existen excepciones, son miembros de la superfamilia MFS. Hasta el momento, se han descrito más de 20 y las más comunes incluyen TetA y TetB en gramnegativos

mientras que TetK y TetL son los más prevalentes en grampositivos (Krulwich et al., 2001). También son destacables OtrB, OtrC y Tcr, en *Streptomyces*, similares a nivel de secuencia a TetK y TetL (Dairi et al., 1995; McMurry and Levy, 1998). Además de estos sistemas de expulsión específicos de tetraciclina, se han descrito numerosos mecanismos que regulan la entrada y acumulación de tetraciclinas a nivel intracelular. Destacan mutaciones que afectan a la expresión o función de proteínas reguladoras, bombas o porinas (Grossman, 2016). Son de especial interés las bombas de expulsión de la superfamilia RND AcrAB-TolC en *Enterobacteriaceae*, MexAB-OprM en *Pseudomonas* así como el transportador de la superfamilia ABC VcaM en *Vibrio* (Khan et al., 2018; Munita and Arias, 2016).

Finalmente, se ha vinculado el gen *tetU* con la resistencia leve a tetraciclinas en *Enterococcus*. Este gen produce una proteína pequeña que no está relacionada a nivel de secuencia con ningún otro mecanismo conocido de resistencia a tetraciclina. Su mecanismo de acción queda por dilucidar a día de hoy (Ridenhour et al., 1996).

1.4.6 Antagonismo del metabolismo del folato

i) Sulfamidas

Las sulfamidas (Figura 1.9) (CAS 63-74-1) son agentes antibacterianos sintéticos usados desde los años treinta (Domagk, 1935) que están formados por un grupo sulfamida unido a un anillo aromático. Las sulfamidas son estructuralmente análogos al PABA (*para-aminobenzoic acid*) y actúan como inhibidores competitivos de la DHPS (*di-hydro-pteroate synthase*), codificada por el gen *folP*. La DHPS participa en la síntesis de folato utilizando PABA como substrato y la inhibición por las sulfamidas, por ende, resulta en una inhibición del crecimiento (Sköld, 2000). Se tratan de compuestos de amplio espectro con

efectividad contra bacterias gramnegativas y grampositivas (Foltzer and Reese, 1987).

Su continuo uso en clínica durante la Segunda Guerra Mundial conllevó la aparición de las primeras cepas resistentes durante los años 40 (Davenport, 2012). Los mecanismos que principalmente generan resistencia a sulfamidas consisten en mutaciones cromosómicas en el gen *folP* o bien en el uso de enzimas alternativas codificadas en elementos genéticos móviles.

Se han aislado mutantes resistentes a sulfamidas por un aumento de producción de PABA (Landy et al., 1943), pero el mecanismo más común mediante el que se obtienen mutantes resistentes a sulfamidas consiste en mutaciones en el gen *folP*. En este caso, se ha demostrado que estas mutaciones se producen en diferentes regiones conservadas de dicho gen que disminuyen la afinidad de DHPS por la sulfamida mientras mantienen o aumentan su afinidad por PABA (Sköld, 2000).

A pesar de que se han reportado múltiples casos de variantes resistentes a *folP* cromosómicas, la resistencia clínica a las sulfamidas es predominantemente transmitida por elementos genéticos móviles y mediada por los genes *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*, *sul4*) que codifican DHPS alternativas resistentes a la sulfamidas (Sköld, 2001). El primero en ser descubierto, *sul1*, se encuentra codificado principalmente en integrones de clase 1 junto con otros genes de resistencia, mientras que *sul2* está codificado en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncQ (van Treeck et al., 1981). Ambas variantes son las que parecen estar presentes con más frecuencia en organismos patógenos nosocomiales (Rådström et al., 1991). Por otra parte, la variante *sul3* se describió en plásmidos conjugativos de *E. coli* y se encuentra flanqueada por dos copias del elemento de inserción IS15 Δ /26 (Perreten and Boerlin, 2003). Más recientemente se ha descrito en India la variante *sul4* asociado con el elemento ISCR20 tanto en muestras ambientales como clínicas (Marathe et al., 2019; Razavi et al., 2017). Se ha demostrado que la presencia de ciertos genes *sul* confiere un aumento en la *fitness* del microorganismo que los codifica, incluso en ausencia de selección por sulfamidas (Enne et al., 2004).

Finalmente, el catabolismo bacteriano de las sulfamidas ha demostrado desempeñar un importante papel en la resistencia contra este tipo de antibacterianos. Recientemente se ha reportado una sulfamida monooxigenasa denominada SulX en *Microbacterium* que es la responsable de los primeros pasos de la biodegradación de las sulfamidas. En concreto, este microorganismo ha demostrado ser capaz de crecer con este tipo de antibacteriano como fuente única de carbono. En dicho estudio se ha demostrado también que la adquisición de los genes responsables de la degradación de sulfamidas confiere resistencia a este compuesto (Kim et al., 2019).

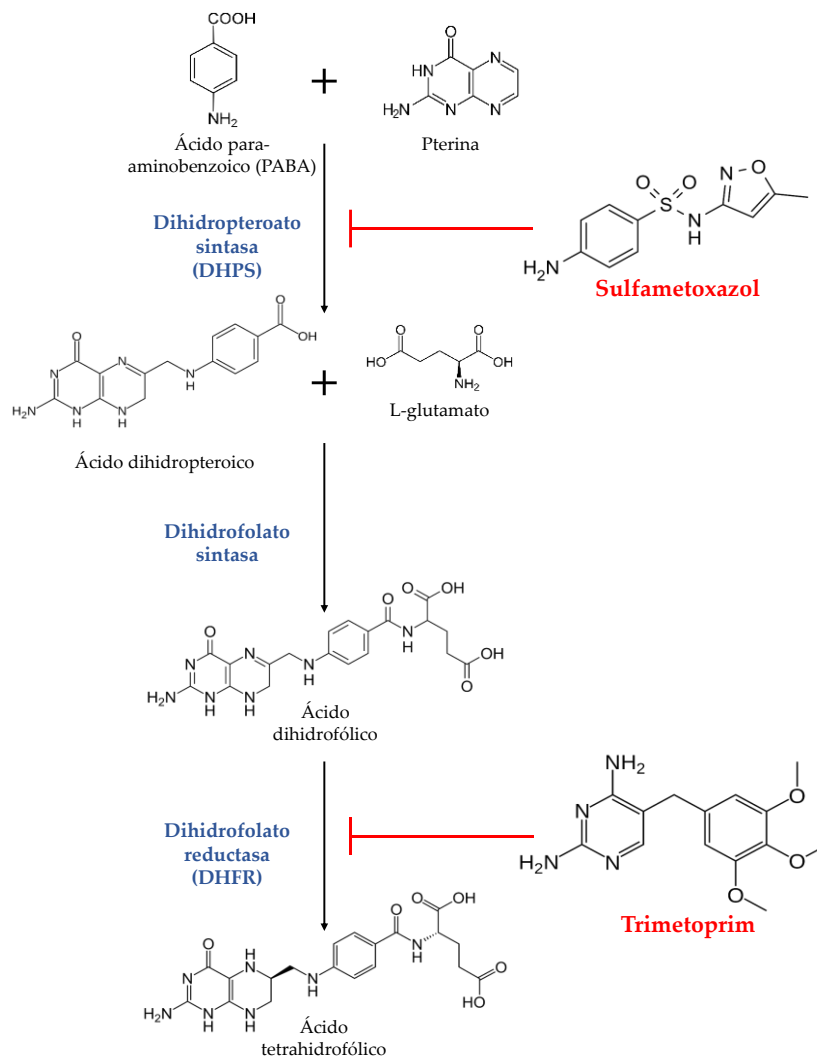


Figura 1.9. Pasos intermedios de la ruta de biosíntesis del folato que son bloqueados por la acción de las sulfamidas y el trimetoprim.

ii) Trimetoprim

El trimetoprim (Figura 1.9) (CAS 738-70-5) es una di-aminopirimidina sintética con actividad antibacteriana desarrollada en los años sesenta (Cooper and Wald, 1964; Quinlivan et al., 2000). Estructuralmente es análogo al ácido dihidrofólico, de tal forma que se une de forma competitiva a la DHFR (*dihydrofolate reductase*) inhibiendo así la síntesis de folato, de forma similar a las sulfamidas (Sköld, 2001). Por lo tanto, el uso sinérgico de sulfamidas y trimetoprim comporta un potente efecto bactericida al producir un bloqueo en dos pasos intermediarios en la vía de síntesis de folato (Masters et al., 2003) Así, y bajo el nombre de co-trimoxazol (Hall, 1974), se han administrado conjuntamente desde el año 1974 para el tratamiento de ciertas infecciones. La actividad antibacteriana mostrada por el trimetoprim es efectiva contra la mayoría de bacterias gramnegativas y grampositivas (Gleckman et al., 1981).

La resistencia a trimetoprim, igual que las sulfamidas, es común en aislados clínicos y, al ser usados conjuntamente por su efecto sinérgico, los genes que confieren resistencia a trimetoprim y sulfamidas se suelen encontrar hacinados conjuntamente en elementos genéticos móviles. Dichos genes codifican enzimas alternativas que confieren resistencia al trimetoprim, aunque también se han aislado cepas resistentes como consecuencia de mutaciones en el gen *folA* cromosómico.

La resistencia cromosómica a trimetoprim, de forma similar a lo ya comentado para las sulfamidas, puede originarse mediante mutaciones en el gen *folA*. Estas mutaciones han sido reportadas tanto a nivel de promotor aumentando la expresión de *folA*, como en la secuencia codificante produciendo variantes génicas resistentes al trimetoprim (Sköld, 2001; Toprak et al., 2011). Curiosamente, se ha demostrado que la resistencia a trimetoprim puede producirse mediante la sobreexpresión de *folA* mientras que la resistencia a sulfamidas no se produce por un aumento de expresión de *folP*. Esta diferencia se debe a que mientras que el trimetoprim directamente inhibe la DHFR, las sulfamidas compiten con el PABA

para acceder a la DHPS. En situaciones normales, la DHPS cataliza la formación de dihidropteroato a partir de pterina y PABA, sin embargo, cuando la DHPS entra en contacto con una molécula de sulfamida se genera un metabolito inactivo dihidropterina - sulfamida provocando una disminución en la concentración intracelular de pterina, necesaria para producir más dihidropteroato. Por tanto, el factor limitante para la producción de dihidropteroato es la ratio PABA:sulfamida, que no puede ser alterado por la sobreexpresión de *folP* (Palmer and Kishony, 2014).

La mayoría de aislados clínicos resistentes a trimetoprim no son debidos a mutaciones cromosómicas, sino a la adquisición de variantes resistentes a través de elementos genéticos móviles. Inicialmente, las variantes adquiridas de DHFR resistentes se clasificaban en dos grandes familias: *dfrA* y *dfrB* (Howell, 2005). El primer grupo, homólogos al gen *folA*, está formado actualmente por más de treinta variantes diferentes con una longitud media de 160 aminoácidos; mientras que el segundo grupo, que no presenta ni similitud en secuencia ni en estructura con los DHFR cromosómicos (Alonso and Gready, 2006), cuenta con ocho variantes de unos 80 aminoácidos (van Hoek et al., 2011). En el grupo de los *dfrA*, se pueden diferenciar dos subgrupos con gran impacto clínico: el grupo *dfrA1*, con doce miembros, y el grupo *dfrA12*, con cinco. Las variantes *dfrA34*, *dfrA35* y *dfrA36* son las últimas reportadas (Ambrose and Hall, 2019; Tagg et al., 2019; Wüthrich et al., 2019). Adicionalmente, se han descrito en elementos móviles de grampositivos los genes *dfrD*, *dfrE*, *dfrG*, *dfrK* y *dfrF* con elevada similitud con los genes del grupo *dfrA* (Coque et al., 1999; van Hoek et al., 2011).

1.5 Origen y evolución de la resistencia antibacteriana: ¿Regreso a la era pre-antibiótica?

Los antibióticos son compuestos ancestrales y, por ende, la resistencia a los mismos también lo es. En este sentido, los estudios metagenómicos de ambientes remotos, preservados y antiguos han desechado la noción de que la resistencia a los antibióticos haya surgido en respuesta a su uso antropogénico. Por ejemplo, se han identificado genes de resistencia a β -lactámicos, tetraciclina y aminoglicósidos con una antigüedad de 5.000 años en muestras de permafrost siberiano (Perron et al., 2015). En otro estudio similar llevado a cabo en muestras de permafrost en Canadá de 30.000 años de antigüedad se detectaron genes de resistencia a β -lactámicos, tetraciclina y glicopéptidos (D'Costa et al., 2011). Asimismo, se han aislado cepas altamente resistentes a antibióticos que codifican genes de resistencia de hasta catorce grupos diferentes en una cueva mexicana aislada desde hace cuatro millones de años (Bhullar et al., 2012). Finalmente, también se han secuenciado genes de resistencia a antibióticos (β -lactámicos, fosfomicina, cloranfenicol, aminoglicósidos, macrólidos, vancomicina...) en microorganismos aislados del microbioma de una momia peruana del siglo XI (Santiago-Rodríguez et al., 2015).

De forma concluyente estos estudios demuestran que la resistencia a los antibióticos es anterior a su uso clínico y que las variantes genéticas que originan los genes clínicos de resistencia están distribuidas en el pangenoma bacteriano. Por tanto, está ampliamente demostrado que los genes de resistencia a los antibióticos presentes en la actualidad en bacterias patógenas se han originado a partir de genes homólogos disponibles desde tiempos ancestrales en los microorganismos productores de los antibióticos o en sus competidores naturales (Aminov and Mackie, 2007). Estos genes son captados por elementos genéticos móviles y transferidos a bacterias susceptibles que proliferan rápidamente en presencia de agentes antibacterianos (Aarestrup, 2006). De este modo, la existencia de un gran

repertorio de elementos genéticos móviles conjuntamente con la enorme disponibilidad de genes de resistencia ancestrales dibujan un escenario evolutivo idóneo para la rápida proliferación de bacterias resistentes a los antibacterianos una vez introducidos en el ambiente clínico (Aminov and Mackie, 2007). Adicionalmente, la globalización permite la eficiente diseminación de genes y bacterias resistentes mediante el ingente comercio de productos alimenticios, animales vivos, viajes, etc (Wright, 2019).

1.5.1 Resistencia a los antibióticos en los microorganismos productores

Las bacterias productoras de antibióticos presentan los mecanismos adecuados para auto-protegerse (Cundliffe and Demain, 2010). La relación entre la producción de un antibiótico y resistencia fue advertida por primera vez en 1973 (Benveniste and Davies, 1973). A partir de entonces, se ha demostrado reiteradamente que estos mecanismos de resistencia son genética y bioquímicamente muy parecidos a los genes que generan resistencia en patógenos.

Como se ha indicado previamente, uno de los mecanismos de resistencia más común involucra modificaciones en la diana del antibacteriano. La resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B, por ejemplo, está ampliamente distribuida en bacterias productoras de macrólidos como consecuencia de los genes *erm*, que metilan el residuo A2058 del rRNA 23S del ribosoma (Leclercq, 2002). Así, se han identificado los genes *ermE* en *S. erythraeus*; *ermS* y *ermN* en *Streptomyces fradiae*; *ermO* y *erm2* en *Streptomyces ambofaciens*; *ermH* en *Streptomyces thermotolerans*; *ermW* en *Micronospora griseorubida* y *ermI* en *Streptomyces mycarofaciens*. Del mismo modo, se han identificado en organismos productores de lincosamidas los genes *ermU* y *clr* (tipo *erm*) en *S. lincolnensis* y en *Streptomyces caelestis*, respectivamente (Cundliffe and Demain, 2010). Un caso similar ocurre con los aminoglicósidos ya que se han identificado metilasas que generan resistencia a

aminoglicósidos y que metilan la posición G1405 del rRNA 16S (*kmr* en *S. kanamyceticus*, *kgmB* en *Streptomyces tenebrarius*, *grmA* en *Micromonospora purpurea*, *sgm* en *Micromonospora zionensis* y *fmrO* en *Micromonospora olivasterospora*) así como rRNA 16S metilasas que metilan la posición A1408 (*kamB* en *S. tenebrarius*, *kamA* en *Streptomyces tenjimariensis* y *kamC* en *Saccharopolyspora hiruta*) (Cundliffe and Demain, 2010). Finalmente, también destaca en *A. orientalis*, uno de los organismos productores de glicopéptidos, la presencia de homólogos de los genes móviles *vanHAX* que confieren resistencia clínica a vancomicina (Marshall et al., 1998).

En el caso de la resistencia originada por protección de la diana, se ha descrito en *Streptomyces rimosus*, productor de la oxi-tetraciclina, la proteína OtrA que genera resistencia a tetraciclinas en bacterias nosocomiales (Ohnuki et al., 1985). Uno de los casos más sorprendentes es el de los genes *qnr*, que son genes codificados en plásmidos y que generan resistencia clínica a quinolonas. Las quinolonas son, como se ha mencionado anteriormente, agentes antibacterianos sintéticos que inhiben la replicación del DNA (Correia et al., 2017). Se ha descrito que los genes *qnr* derivan de genes que protegen la DNA girasa de ciertos antibióticos (como la microcina B17) y que están codificados en los genomas de las bacterias acuáticas *Shewanella algae* y *Vibrio splendidus*, dando lugar a las variantes móviles *qnrA* y *qnrS*, respectivamente (Cantón, 2009; Tran and Jacoby, 2002).

Asimismo, las bacterias productoras de antibióticos codifican enzimas que les permiten la inactivación de éstos. En microorganismos productores de aminoglicósidos, por ejemplo, se han identificado numerosos enzimas que modifican, inactivan y generan auto-resistencia contra este tipo de antibióticos. A modo de ejemplo, se han identificado la fosfotransferasa APH(3') y las acetiltransferasas AAC(3) y ACC(2') en el productor de neomicina *S. fradiae*, así como la fosfotransferasa AAC(6') en el productor de kanamicina *S. kanamyceticus* (Cundliffe and Demain, 2010). No obstante, no se han identificado adeniltransferasas modificadoras de aminoglicósidos codificados en genomas de los microorganismos productores hasta el momento. En el caso de la fosfomicina, producida por ciertas especies de *Streptomyces* y por *Pseudomonas syringae*, se han

descrito homólogos de los genes móviles *fomA* en diversas especies productoras del género *Streptomyces*, así como del gen *fosC* (homólogo del gen *fomA*) en el genoma de *P. syringae* (Cundliffe and Demain, 2010). Las β -lactamasas son enzimas ancestrales que existen desde antes de la introducción clínica de los β -lactámicos (Bush, 2018), de hecho, como se ha mencionado con anterioridad, el primer microorganismo resistente a este tipo de antibióticos se aisló antes de la introducción de los β -lactámicos (Kirby, 1944). Sin embargo, el origen de las β -lactamasas constituye un caso especial, puesto que los productores naturales de esta familia de antibióticos son hongos, intrínsecamente resistentes a β -lactámicos puesto que su pared celular no contiene peptidoglicano (Gao et al., 2017). Las β -lactamasas de la clase CTX-M, por ejemplo, son consideradas un paradigma en la evolución de un mecanismo de resistencia. Así, se ha descrito que la movilización independiente de genes cromosómicos de diferentes especies del género *Kluyvera*, bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* y que no son productoras de antibióticos β -lactámicos, ha derivado en las variantes clínicas de β -lactamasas CTX-M (Cantón et al., 2012).

También se han identificado numerosos casos de auto-resistencia desempeñados por transportadores de membrana y bombas de expulsión en organismos productores de antibióticos. Así, se ha confirmado la presencia en *S. rimosus* del gen *otrB* que codifica una bomba de expulsión de tetraciclinas de la familia MFS o los también transportadores de la familia MFS *lmrA* y *lmrC* en *S. lincolnensis*, productor de lincosamidas. También se han identificado transportadores ABC en los *clusters* de biosíntesis de neomicina de diversas especies bacterianas. Igualmente se ha demostrado la presencia de transportadores MFS en cepas de *Streptomyces* productoras de kanamicina y gentamicina. En la misma línea, se han identificado en el productor de cloranfenicol los genes *cmII*, *cmX* y *cmIF*, que codifican hipotéticos transportadores de clase ABC y MFS similares a los que se encuentran en elementos genéticos móviles presentes en aislados hospitalarios (Jiang et al., 2017). En concordancia con todos estos datos, *S. fradiae* codifica en el *cluster* de biosíntesis de fosfomicina, además del gen *fomA* que participa en la inactivación de fosfomicina como ya se ha indicado previamente,

los genes *phmDCE* cuyo producto forma un transportador de clase ABC (Cundliffe and Demain, 2010).

Por otra parte, también se ha hipotetizado que el origen de los genes de resistencia a antibióticos no proviene siempre de genes homólogos codificados en los *clusters* de biosíntesis de los organismos productores. En este sentido, se han reportado numerosos casos de determinados genes de resistencia que han evolucionado a partir de genes que codifican enzimas con otras funciones metabólicas. A modo de ejemplo, estudios estructurales han relacionado las nucleotidiltransferasas de aminoglicósidos (ANT) con la DNA polimerasa β (Cox et al., 2015); así como el gen *vgB* responsable de la inactivación de estreptograminas con enzimas que hidrolizan el anillo lactona del muconato (Morar et al., 2012).

1.5.2 Evolución y diseminación de los genes de resistencia a antibacterianos

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las comunidades microbianas constituyen un importante reservorio de genes de resistencia que pueden ser globalmente diseminados (Brinkac et al., 2017). A pesar de todas las pruebas existentes que ponen de manifiesto la relación existente entre los genes de resistencia presentes en los aislados clínicos y las cepas productoras, a veces es difícil establecer mediante la comparación de secuencias un vínculo directo entre genes de productores y patógenos. Esto es principalmente debido al hecho que los genes de resistencia en los productores y en los patógenos muestran en determinadas ocasiones una elevada divergencia de secuencia sobre todo en lo que hace referencia al contenido GC y al uso de codón (Peterson and Kaur, 2018). Este hecho sugiere que la transferencia entre productores y patógenos podría haber ocurrido hace mucho tiempo lo que explicaría la citada divergencia (Marshall et al., 1998; Peterson and Kaur, 2018). En este sentido, y como ya se ha mencionado con anterioridad, los genes de resistencia están mucho más extendidos en las poblaciones microbianas ambientales de lo que se creía originalmente (Bhullar et

al., 2012; D'Costa et al., 2011; Perron et al., 2015; Santiago-Rodriguez et al., 2015). Colecciones históricas de cepas bacterianas de origen hospitalario revelan la presencia de plásmidos, si bien destaca en ellas la ausencia de genes de resistencia. Sin embargo, con el uso de compuestos antibacterianos a partir de los años treinta se han ido acumulando múltiples genes de resistencia en plásmidos y cromosomas de este tipo de microorganismos (Waglechner and Wright, 2017).

La diseminación de genes de resistencia entre estas poblaciones bacterianas se produce por mecanismos de transferencia genética que implican transformación, transducción por bacteriófagos, conjugación o vesículas de membrana (Thomas and Nielsen, 2005).

1.5.2.1 Conjugación

La conjugación consiste en la transferencia de DNA a través de un proceso que requiere la formación de un agregado entre la célula donadora y la receptora que se forma como consecuencia de la retracción de los *pili* conjugativos. Una vez formado el agregado celular, el DNA se transfiere de la célula donadora a la receptora a través del sistema de secreción tipo IV codificado en el plásmido (von Wintersdorff et al., 2016). Este proceso, adicionalmente, puede estar promovido por la exposición a ciertos agentes antibacterianos facilitando así la movilización de los genes de resistencia entre cepas (Liu et al., 2019; Møller et al., 2017).

Los plásmidos son elementos genéticos extra-cromosómicos auto-replicables. La persistencia de estos elementos genéticos es superior cuando codifican genes que mejoran la *fitness* de la célula hospedadora, como genes de resistencia en presencia de antibacterianos. En consecuencia, un gran número de genes de resistencia circulan en los plásmidos y se diseminan entre poblaciones mediante la conjugación (Lerminiaux and Cameron, 2019). La conjugación de plásmidos es el mecanismo más común y eficiente para la propagación de genes de resistencia (Sultan et al., 2018); y se ha descrito en numerosos ecosistemas como en insectos, suelo, agua y sobretodo en entornos hospitalarios donde la presencia

de agentes microbianos es más destacable (Davison, 1999). La propagación de plásmidos de resistencia a antibióticos en patógenos humanos está especialmente bien estudiada, y muestra que una vez que los genes de resistencia se han establecido en plásmidos, pueden extenderse rápidamente a través de diferentes cepas, especies e incluso otros géneros bacterianos (von Wintersdorff et al., 2016). La captura de genes de resistencia por parte de plásmidos suele estar determinada principalmente por la presencia de transposones e integrones (Figura 1.10).

Los transposones (Figura 1.10) son elementos genéticos móviles formados por secuencias de inserción y genes accesorios, comúnmente genes de resistencia a antibióticos. Las IS (*Insertion Sequences*) son los elementos genéticos móviles más simples y codifican una transposasa, responsable de su transposición, flanqueada por segmentos de secuencia invertidas. Los transposones suelen estar asociados a plásmidos con los que se movilizan entre bacterias y, una vez en una célula receptora, pueden saltar y transferir los genes de resistencia al cromosoma o a otros plásmidos del microorganismo hospedador (Babakhani and Oloomi, 2018; van Hoek et al., 2011).

Por otro lado, los integrones (Figura 1.10) son elementos genéticos que incluyen una integrasa, codificada en el gen *intI*, que les permite capturar y movilizar genes, en particular genes de resistencia a antibacterianos. La integración de estos genes es específica de forma que se posicionan bajo control de un promotor que se sitúa en dirección opuesta a *intI*. Los integrones no codifican genes responsables de su movilización de manera que se movilizan al asociarse a transposones o a plásmidos (Mazel, 2006).

Adicionalmente, se han identificado los llamados ICE (menos comunes que transposones e integrones) que son elementos auto-transmisibles que codifican la maquinaria de conjugación. Estas entidades son altamente versátiles y, además de conjugar, tienen la capacidad de integrarse y escindirse, de forma similar a los transposones, diseminando así genes de resistencia a antibacterianos, factores de virulencia o genes de resistencia a metales pesados. No obstante, los ICE son incapaces de replicarse autónomamente de forma vegetativa por lo que su

estabilización en una célula bacteriana requiere su integración en el cromosoma o plásmidos que esta contenga (van Hoek et al., 2008; von Wintersdorff et al., 2016).

Una característica común de los integrones y de los ICE es que su esparcimiento por las poblaciones bacterianas se estimula a través de la inducción del sistema de reparación SOS (Guerin et al., 2009) que es una respuesta de las células bacterianas a daños en el DNA. En este sentido debe recordarse que gran cantidad de antibióticos inducen este sistema SOS por lo que se da la circunstancia que los propios antibióticos para los que determinan resistencia integrones e ICEs pueden disparar su distribución (Baharoglu and Mazel, 2014).

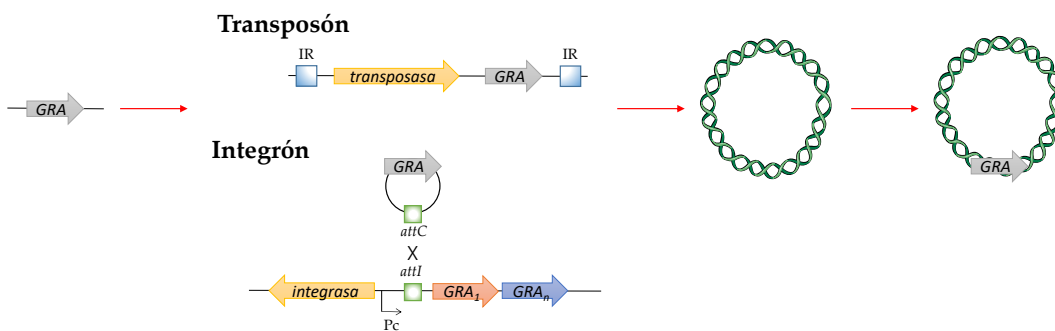


Figura 1.10. Los genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA) presentes en el pan-genoma bacteriano son capturados principalmente mediante transposones e integrones y asociados a plásmidos movilizables mediante los que se transfieren entre bacterias.

1.5.2.2 Transformación

La transformación es un proceso genético de captura, incorporación y expresión de DNA del medio, observado por primera vez en cepas de *S. pneumoniae* el 1928 (Griffith, 1928). Para que tenga lugar la transformación, debe haber DNA libre en el entorno extracelular; la bacteria receptora debe estar en un estado de competencia; y el DNA transformante debe estabilizarse, por integración en el cromosoma bacteriano o, en el caso de plásmidos, por su re-circularización (von Wintersdorff et al., 2016). Ciertas bacterias son competentes de manera natural, pero la mayoría de bacterias únicamente son competentes bajo ciertas condiciones, como la presencia de auto-inductores, el estado nutricional o

situaciones de estrés como las originadas por la exposición a antibióticos. Por consiguiente, los antibióticos no solo seleccionarían cepas resistentes, sino que también estimularían la transformación de los genes de resistencia (Peterson and Kaur, 2018; Prudhomme et al., 2006). De hecho, la transformación se ha descrito como un factor que ha jugado un papel importante en la evolución de las cepas de resistencia a antibióticos de *Streptococcus* y *Neisseria*, en parte gracias a su estado de competencia natural (von Wintersdorff et al., 2016).

1.5.2.3 Transducción

Los bacteriófagos juegan un papel importante en la evolución del microbioma de cualquier entorno. La transducción es un proceso en el cual en una partícula vírica se encapsida y transfiere DNA bacteriano, por tanto, tiene potencial para la propagación de genes de resistencia, especialmente entre los miembros de la misma especie debido a la elevada especificidad de los bacteriófagos (Balcazar, 2014; Lerminiaux and Cameron, 2019).

La transferencia de genes mediada por bacteriófagos puede ocurrir por transducción especializada, generalizada o lateral (Figura 1.11). En la transducción generalizada los bacteriófagos pueden empaquetar cualquier segmento de DNA bacteriano, mientras que la transducción especializada y lateral están limitadas a un conjunto específico de genes. La transducción generalizada ocurre cuando un bacteriófago encapsida por error DNA bacteriano mediante el reconocimiento de regiones pseudo-*pac* en el cromosoma o bien en elementos móviles presentes en las bacterias. Las regiones pseudo-*pac* son homólogas a las llamadas regiones *pac*, presentes en los concatámeros del DNA replicado del bacteriófago, y que marcan el inicio de la encapsidación (Lennox, 1955). En cambio, la transducción especializada se produce como consecuencia de una escisión imprecisa de un profago, de modo que únicamente son encapsidados los genes flanqueantes del lugar de integración limitando mucho la capacidad de este tipo de transducción en la modelación del microbioma (Muniesa et al., 2011). Finalmente, se ha descrito

recientemente la transducción lateral en *S. aureus*. En este tipo de transducción, el profago inicia su empaquetamiento *in situ* antes de escindirse del cromosoma bacteriano de modo que los genes bacterianos ubicados hasta varias kilobases del profago son empaquetados y pueden transferirse a nuevas células bacterianas (Chen et al., 2018). Un proceso similar se había descrito ya para el bacteriófago Mu de *E. coli* (Burns et al., 1990).

La transducción generalizada es el tipo de transducción que mayor contribuye a la evolución del microbioma (Penadés et al., 2015). Así, se ha demostrado que el contenido de genes de resistencia en partículas víricas en ratones tratados con antibióticos es significativamente superior al de ratones sin tratar (Modi et al., 2013). De forma similar, un estudio reciente destaca la importancia que tienen los bacteriófagos de bacterias patógenas como reservorio de genes de resistencia a antibacterianos y, por tanto, como medio de diseminación de los mismos entre microorganismos (Debroas and Siguret, 2019).

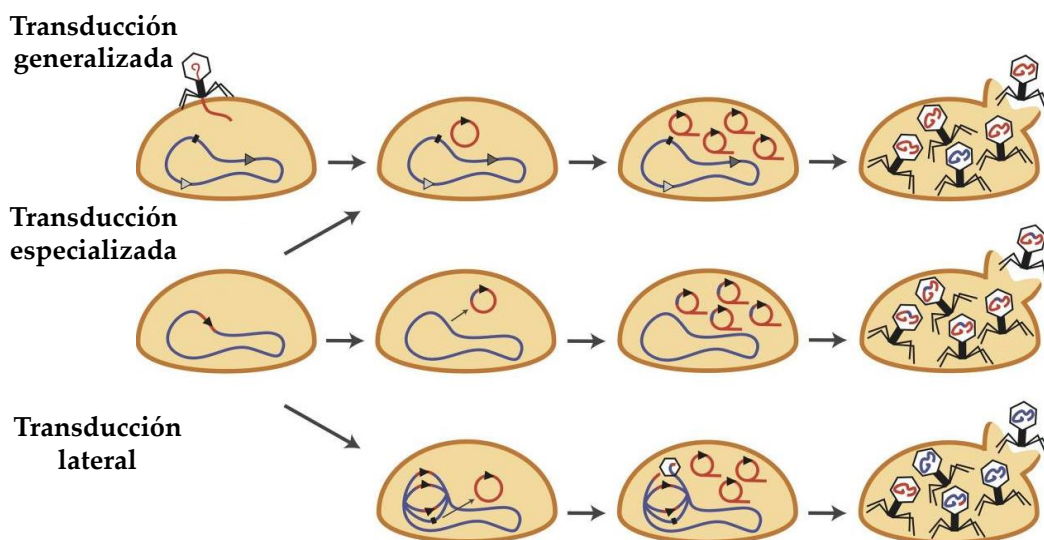


Figura 1.11. Mecanismos de transducción genética. La terminasa inicia el empaquetamiento del DNA desde las regiones *pac* (triángulos negros) situadas en el genoma del bacteriófago (rojo) o desde las regiones *pseudo-pac* (triángulos grises) situadas en el genoma bacteriano (azul). Modificada de (Chiang et al., 2019).

1.5.2.4 Vesículas de membrana

Las vesículas de membrana son estructuras celulares esféricas delimitadas por una bicapa lipídica que se forman a partir de la superficie celular bacteriana. Estas estructuras participan en procesos biológicos muy diversos incluyendo la virulencia, la exportación de metabolitos, la comunicación entre células o la transferencia horizontal de genes (Toyofuku et al., 2019). Las vesículas de membrana más comunes son producidas a partir de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, sin embargo, también se ha descrito su formación en bacterias grampositivas a través de un proceso que involucra la protrusión de la membrana citoplasmática a través de la pared bacteriana (Domingues and Nielsen, 2017).

El contenido de las vesículas de membrana es muy variable e incluye, entre otros, ácidos nucleicos. El DNA presente en las vesículas de membrana es el que se encuentra en el citoplasma de la célula y corresponde al cromosoma o a los posibles plásmidos que esta contenga. A pesar de ello, aun no está claro si la presencia de ácidos nucleicos en estas vesículas es consecuencia de un proceso activo o de un proceso aleatorio (Biller et al., 2014; Domingues and Nielsen, 2017). En cualquier caso, las vesículas de membrana que transportan material genético pueden provocar un evento de transferencia horizontal contribuyendo a la difusión de genes diversos, como genes de resistencia a los antibacterianos o genes de virulencia (Klieve et al., 2005). Hasta la fecha, se ha demostrado la transferencia génica mediante vesículas de membrana en bacterias como *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Ruminococcus* o *Thermococcus* (Domingues and Nielsen, 2017).

1.5.3 Bacterias multirresistentes ¿Regreso a la era pre-antibiótica?

La liberación de los antibacterianos al ambiente se produce de forma constante desde la industria farmacéutica donde son producidos, hospitales con orinas y heces de los enfermos en forma de aguas residuales, excrementos de animales o directamente al entorno acuático cuando son usados en piscifactorías, e incluso en agricultura con cultivos abonados con lodos procedentes de las plantas de tratamiento (Berglund, 2015). Algunos de estos antibacterianos se degradan con cierta facilidad, como las penicilinas, mientras que otros son considerablemente más persistentes, como las tetraciclinas, lo que les permite prevalecer durante más tiempo en el medio y acumularse a concentraciones más altas (Larsson, 2014).

Esta continua presión impuesta por la exposición a diferentes antibacterianos en el ambiente desde mediados del siglo XX, conjuntamente con la elevada plasticidad genética bacteriana, ha conllevado a la selección y acumulación de genes de resistencia en la mayoría de bacterias patógenas (Medina and Pieper, 2016). Los genes de resistencia contra diferentes antibacterianos tienden a hacinarse en el mismo elemento genético móvil, especialmente en integrones (Gillings, 2014). Dado que ciertas infecciones son tratadas con cócteles de antibacterianos, así como ciertos fármacos se usan en combinación por su acción sinérgica, esta co-localización de genes de resistencia es muy frecuente y difícil de disolver (Bengtsson-Palme et al., 2018). Adicionalmente y como ya se ha indicado previamente, existen diferentes estudios que sugieren que el uso de ciertos compuestos antibacterianos promovería la transferencia horizontal de genes (Baharoglu et al., 2010; Liu et al., 2019; Lopatkin et al., 2016; Møller et al., 2017; Prudhomme et al., 2006). En consecuencia, el uso extensivo de estos agentes ha conllevado a la co-selección de genes de resistencia, a su transferencia y fijación y, en definitiva, al aumento de la presencia de múltiples de genes de resistencia en

poblaciones bacterianas en muchos ecosistemas diferentes (Figura 1.12) (Aminov and Mackie, 2007).

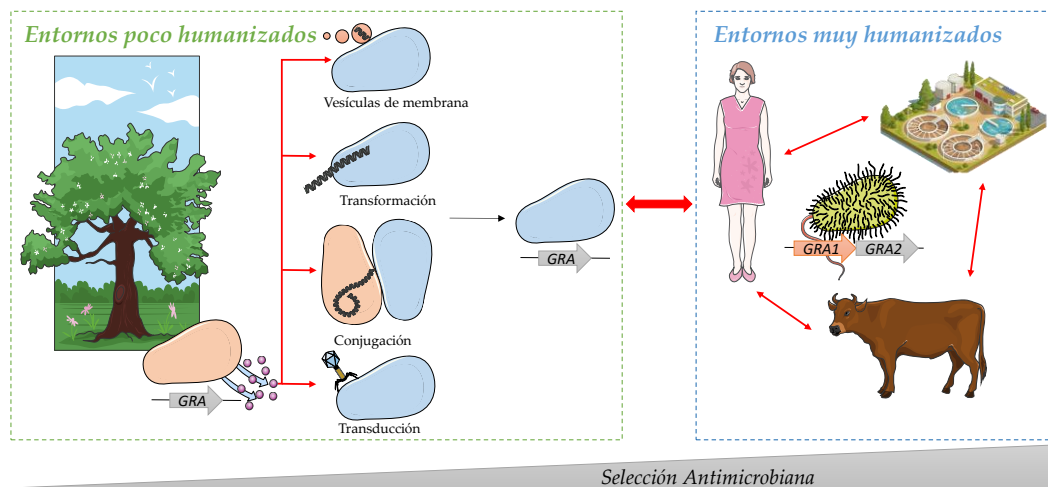


Figura 1.12. Los genes de resistencia a los antibióticos (GRA) presentes en bacterias productoras (representadas en naranja) son movilizados mediante mecanismos de transferencia genética (transformación, transducción por bacteriófagos, conjugación o mediante vesículas de membrana) a bacterias cercanas en entornos con poca exposición a los antibióticos. Estas comunidades bacterianas, dominadas por bacterias (representadas en color azul) que generalmente no están asociadas a enfermedades, constituyen un importante reservorio de GRA. Estos GRA pueden ser rápidamente diseminados al entrar en contacto con entornos más humanizados, donde el uso de antibióticos es intenso y donde dominan las bacterias patógenas (representadas en verde) que van acumulando GRA. La transferencia genética puede darse a su vez desde microorganismos presentes en entornos muy humanizados hacia entornos menos humanizados aumentando el reservorio de GRA.

En este contexto, se han definido los conceptos de bacterias MDR (**M**ultidrug-resistant), XDR (**E**xtensively **d**rug-resistant) y PDR (**P**andrug-resistant) para referir a las bacterias multiresistentes. Un microorganismo es MDR cuando es resistente al menos a un agente antibacteriano de tres o más categorías. Una bacteria XDR es aquella que presenta resistencia a, como mínimo, un agente de todos los grupos de antibacterianos, pero no a todos. Finalmente, un microorganismo es PDR cuando es resistente a todos los agentes antibacterianos de todas las categorías (Magiorakos et al., 2012).

La multirresistencia es conocida desde principios de los años 90, cuando se aislaron cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes y, a partir, de entonces el número de microorganismos reportados ha ido en aumento (Arakawa, 2020). De los casos más conocidos, destacan *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, que es la infección resistente a antibióticos más común en humanos; cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido; así como *Acinetobacter baumannii* multirresistentes o ciertas enterobacterias resistentes a carbapenem (Medina and Pieper, 2016). Estos microorganismos multirresistentes dan lugar a una mayor morbilidad y mortalidad debido a que sus opciones terapéuticas son muy reducidas y los períodos de atención hospitalaria se extienden y son muy costosos (Davies and Davies, 2010).

Además, estos microorganismos a su vez suponen un reservorio muy importante de genes de resistencia que pueden ser transferidos y seleccionados, por la continua exposición a agentes antibacterianos, a otros organismos patógenos en el ambiente hospitalario (Davies and Davies, 2010). No obstante, es aún más alarmante el hecho de que estas bacterias resistentes a los antibióticos tienden a propagarse muy rápidamente no solo en hospitales sino también entre las comunidades de todo el mundo debido a la globalización (Hawkey, 2015). En este sentido, se estima que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibacterianos supondrán la mayor causa de mortalidad para el año 2050, tal como sucedía a principios del siglo XX, en la era pre-antibiótica (Figura 1.2) (Smith and Coast, 2013).

1.6 Futuras estrategias para combatir la resistencia a compuestos antibacterianos

La actual problemática generada por las bacterias multirresistentes, junto con la marcada disminución de la tasa de descubrimiento y/o desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos, representa una amenaza para la salud pública y para la prestación de asistencia sanitaria en todo el mundo (Rello et al., 2019). Históricamente, la prospección de antibióticos consistía en la búsqueda de compuestos activos en muestras de suelo, agua u otros ambientes similares (Moellering, 1998). A nivel educativo, se ha puesto en marcha recientemente el proyecto SWI (*Small World Initiative*), que involucra institutos y universidades (entre las que se encuentra la Universitat Autònoma de Barcelona), y que consiste en la exploración de muestras de suelo en busca de microorganismos productores de nuevos antibióticos (Small World Initiative, 2017).

No obstante, el enfoque más común en la actualidad consiste en la identificación de nuevas dianas con una función celular vital y el posterior desarrollo de inhibidores para bloquear su función (véase el apartado 1.6.1). Desafortunadamente, y hasta el momento, esta aproximación no ha dado como resultado la producción de excesivos agentes antibacterianos significativos en clínica (Silver, 2016). Así, desde un punto de vista químico, los enfoques más efectivos llevados a cabo durante los últimos años para combatir la resistencia son la modificación química de los antibacterianos existentes, y la utilización de potenciadores como los inhibidores de β -lactamasas, de entre los que se destacan el ácido clavulánico o el sulbactam (Chopra et al., 2002; Moellering, 1998). Por consiguiente, es necesario diseñar estrategias nuevas efectivas para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes.

1.6.1 Identificación de nuevas dianas

Como ya se ha mencionado, actualmente uno de los principales enfoques consiste en la identificación, validación y explotación de nuevas dianas para descubrir y desarrollar agentes antibacterianos activos contra especies multirresistentes (Moellering, 2011).

Por un lado, se han identificado nuevas dianas relacionadas con la pared celular bacteriana, indispensable para la colonización de superficies, para la división celular o para el mantenimiento de la forma celular. Así, se han identificado compuestos como el targocil, las tarocinas o la tunicamicina que inhiben la síntesis de ácidos teicoicos (Belete, 2019). De modo similar, se está trabajando con compuestos como la colicina M que se encarga de degradar el lípido II (esencial para la síntesis de peptidoglicano) (Touzé et al., 2012), la lisocina E que inhibe las menaquinonas de la pared celular de grampositivos (esencial para la formación del citocromo y la cadena de transporte de electrones en anaerobios) (Hamamoto et al., 2015) o la afabicina que inhibe la síntesis de ácidos grasos (Belete, 2019; Moellering, 2011).

Por otro lado, se han seleccionado nuevas dianas relacionadas con la síntesis de proteínas. La formilación y la posterior deformilación del aminoácido metionina que inicia la síntesis de proteínas es un paso clave en la síntesis de proteínas bacterianas, pero no en eucariotas y, por tanto, supone una diana interesante para el desarrollo de agentes antibacterianos. De este modo, y hasta el momento, se han diseñado diferentes compuestos con actividad antibacteriana contra las péptido deformilasas, enzimas responsables de este proceso (Jain et al., 2005). Por último, la biosíntesis de lisina está siendo objeto de un creciente interés como diana para el diseño de agentes antibacterianos, ya que es fundamental para la producción de proteínas y meso-diaminopimelato, que es imprescindible para la síntesis de pared celular en bacterias gramnegativas (Hutton et al., 2007).

Asimismo, dado que la formación de *biofilms* contribuye a la patogenicidad y resistencia a los agentes antibacterianos, la búsqueda de compuestos para inhibir dicha formación ha sido objeto de numerosos estudios. Ciertos péptidos como las cahuitamicinas han demostrado ser efectivos *in vitro* para la inhibición de la formación de *biofilms* (Park et al., 2016). Otras estrategias relacionadas consisten en la afectación del *quorum sensing* mediante la inhibición de la síntesis del auto-inductor, mediante análogos como el butiril-SAM; o bien su inactivación mediante lactonasas, acetilasas o paraoxonasas (Belete, 2019).

Finalmente, la inhibición de la división bacteriana mediante el bloqueo de la proteína FtsZ que interviene en la formación del septo central durante la división celular bacteriana, así como la inhibición de *riboswitches* están siendo recurrentemente valorados para el diseño de agentes antibacterianos (Carro, 2019; Moellering, 2011). Un caso especial que se ha estudiado recientemente para disminuir la aparición de cepas resistentes a antibacterianos consiste en la inhibición de la proteólisis de LexA, puesto que un bloqueo de la respuesta SOS podría disminuir la aparición y adquisición de genes de resistencia (Bellio et al., 2020).

1.6.2 Inmunoterapia

La inmunoterapia consiste en la prevención o el tratamiento de infecciones mediante la inducción o supresión del sistema inmunológico. Principalmente, existen dos tipos de inmunoterapia: la inmunoterapia pasiva, que consiste en la utilización de anticuerpos generados *in vitro* contra bacterias patógenas, y la inmunoterapia activa, que pretende activar *in vivo* el sistema inmunológico e inducirlo a elaborar una respuesta específica contra un microorganismo patógeno (Delany et al., 2014).

La inmunoterapia activa incluye, por tanto, las vacunas. Las vacunas son preparaciones que se introducen en un organismo con el fin de desarrollar una

respuesta inmune que prevenga o trate una enfermedad infecciosa. Estas preparaciones normalmente contienen microorganismos muertos o atenuados, así como proteínas o polisacáridos de superficie del patógeno. El efecto de las vacunas no es tan inmediato como el de otras estrategias discutidas en este apartado, debido al tiempo necesario para generar la respuesta inmunitaria contra el patógeno (Buchy et al., 2020; Delany et al., 2014). Aunque este tipo de terapia no elimina directamente a un microorganismo, presenta la capacidad de reducir su incidencia y así reducir el uso de los antibióticos (Rello et al., 2019). Adicionalmente, no se conocen casos de resistencia a las vacunas, ejercen una presión selectiva ínfima en el entorno y presentan una duración que oscila entre unos pocos meses a permanente (Mishra et al., 2012). Hasta el momento se han aprobado una treintena de vacunas contra diferentes bacterias y virus y es una de las estrategias que presentan más potencial para combatir la resistencia antimicrobiana (Griesenauer and Kinch, 2017).

Por otro lado, la inmunoterapia pasiva consiste en la utilización directa de anticuerpos en un tratamiento para neutralizar a un patógeno, a sus factores de virulencia o a sus toxinas. Los anticuerpos son de acción rápida y se consideran de bajo riesgo por su elevada seguridad. No obstante su mayor problemática es la duración del tratamiento ya que su efectividad se reduce a unas pocas semanas o meses desde su utilización (Rello et al., 2019). Actualmente se encuentran en ensayo clínico anticuerpos contra *Clostridioides difficile*, *P. aeruginosa*, y *S. aureus*. En el caso de *C. difficile* los anticuerpos neutralizan la toxina B causante de daño e inflamación de la pared intestinal. También existen dos preparaciones de anticuerpos para *P. aeruginosa* que bloquean PcrV, constituyente del sistema de secreción de tipo III y que interviene en la citotoxicidad de esta especie bacteriana. Una de ellas además contiene anticuerpos para neutralizar la proteína PsI, importante para la colonización de *P. aeruginosa*. Finalmente, existen también dos cócteles de anticuerpos contra *S. aureus*. El primero de ellos neutraliza la α -toxina mientras que el segundo se encarga de bloquear también las leucocidinas (Czaplewski et al., 2016; Rello et al., 2019).

1.6.3 Terapia fágica

Históricamente, la terapia fágica empezó a ser considerada a principios del siglo XX, pero su interés decayó como consecuencia del descubrimiento de los antibióticos, si bien ha sido utilizado hasta nuestros días en países del este europeo y en la Unión Soviética.

Con la emergencia de la resistencia a antibacterianos, el interés por la utilización de bacteriófagos para el tratamiento de patógenos está experimentando un renacimiento (Gordillo Altamirano and Barr, 2019). Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias. La terapia fágica consiste en la administración de bacteriófagos virulentos a un paciente con el fin de eliminar las bacterias patógenas responsables de su infección. En el ciclo lítico, los bacteriófagos infectan y lisan a sus bacterias hospedadoras, liberando así la progenie en forma de viriones capaces de infectar más células bacterianas (Gordillo Altamirano and Barr, 2019). Los bacteriófagos poseen una especificidad mucho mayor que los compuestos antibacterianos y, por ende, son mínimos los efectos adversos en células no deseadas (Allen et al., 2014). Sin embargo, debido a esta elevada especificidad, a menudo los bacteriófagos deben ser administrados en cócteles que contienen dos o más bacteriófagos (Rello et al., 2019). Un factor crítico a considerar es el posible desarrollo de resistencia bacteriana a los bacteriófagos, aunque es fácilmente mitigable mediante la utilización de los ya mencionados cócteles (Allen et al., 2014). El potencial antibacteriano de los bacteriófagos ha demostrado ser sinérgico en ocasiones con el de ciertos antibacterianos (Akturk et al., 2019).

A nivel educativo, el proyecto SEA-PHAGES (*Science Education Alliance-Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science*) es un programa de investigación dirigido a estudiantes de grado y coordinado por la Universidad de Pittsburgh con el objetivo de identificar y caracterizar bacteriófagos en muestras de suelo. Estos bacteriófagos son caracterizados mediante técnicas de microbiología clásicas (rango de hospedador, microscopía...) y sus genomas son anotados con herramientas bioinformáticas (Hanauer et al., 2017). De hecho, en el

caso más reciente de terapia fágica se utilizaron bacteriófagos obtenidos, en parte, del programa SEA-PHAGES con el objetivo de eliminar una infección causada por una cepa multirresistente de *Mycobacterium abscessus* en una niña de 15 años (Dedrick et al., 2019).

Tabla 1.1. Resumen de las diferentes estrategias para combatir la resistencia a compuestos antibacterianos. Modificada de (Allen et al., 2014; Ghosh et al., 2019).

<i>Estrategia alternativa</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Limitaciones</i>
Inmunoterapia activa	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada especificidad - Previene infecciones promoviendo protección duradera - Resistencia inusual 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado coste de administración a toda la población - Efecto no inmediato
Inmunoterapia pasiva	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada especificidad - Acción rápida 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevado coste de producción - Vida útil corta
Terapia fágica	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada especificidad - Auto-replicables - Efecto rápido - Sinergia con ciertos antibacterianos 	<ul style="list-style-type: none"> - Inmunogenicidad - Limitaciones de la farmacocinética en ciertos focos infectivos - Generación de resistencia - Preparaciones inadecuadas por posible presencia de restos bacterianos
Endolisinas	<ul style="list-style-type: none"> - Elevada especificidad - Efecto rápido - Resistencia inusual - Sinergia con ciertos antibacterianos 	<ul style="list-style-type: none"> - Producción - Efectividad reducida contra bacterias Gram-negativas - Conocimiento aun limitado
Bacterias depredadoras	<ul style="list-style-type: none"> - Efectivas contra biofilms - Efectivas contra infecciones recalcitrantes 	<ul style="list-style-type: none"> - Interacciones con el hospedador y su microbiota

1.6.4 Endolisinas

Las endolisinas son enzimas codificadas por bacteriófagos que se encargan de degradar el peptidoglicano del hospedador permitiendo la lisis celular y la liberación de la progenie vírica (Schmelcher et al., 2012). Por consiguiente, las endolisinas tienen potencial como agentes terapéuticos alternativos a los antibacterianos ya que han demostrado ser de acción rápida, potentes, tienen baja probabilidad de desarrollar resistencia, son altamente específicas, e inactivas contra células eucariotas (Borysowski et al., 2006; Lin et al., 2017). Adicionalmente, las endolisinas han demostrado eficacia en diferentes modelos animales, así como en la descolonización de mucosas (Haddad Kashani et al., 2018). Aunque son activas contra bacterias grampositivas y gramnegativas, las endolisinas contra grampositivos han resultado ser más efectivas debido a la ausencia de la membrana externa en la pared celular bacteriana, de manera que pueden acceder directamente al peptidoglicano y destruir con más facilidad a estos microorganismos (Gondil et al., 2020; Schmelcher et al., 2012). Hasta la fecha, se han explorado varias endolisinas que son efectivas contra diferentes patógenos, incluyendo diversas especies de los géneros *Streptococcus* y *Mycobacterium*, así como frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (Gondil et al., 2020). De modo similar a la terapia fágica el uso de endolisinas ha demostrado ser sinérgico con ciertos antibacterianos (Becker et al., 2008).

1.6.5 Bacterias depredadoras

Las bacterias depredadoras son menos convencionales que las estrategias alternativas comentadas anteriormente, pero son una propuesta interesante, como alternativa a los compuestos antibacterianos (Allen et al., 2014). Aunque se han identificado numerosas bacterias depredadoras, las más estudiadas han sido las relacionadas con *Bdellovibrio* spp.. Estos microorganismos pertenecen a la clase

INTRODUCCIÓN

Deltaproteobacteria y codifican un amplio arsenal enzimático para la digestión de las bacterias gramnegativas e incluso para el deterioro de biofilms (Pasternak et al., 2013). Durante los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de estas bacterias depredadores por su capacidad para eliminar una variedad de bacterias gramnegativas de diversos géneros en diferentes modelos animales, incluidos múltiples aislados clínicos multirresistentes (Findlay et al., 2019; Shatzkes et al., 2017, 2016). No obstante, aun es necesario determinar cómo persisten estos microorganismos en las comunidades microbianas y cómo interactúan con el sistema inmunitario del hospedador.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El desarrollo de los agentes antimicrobianos supuso uno de los mayores avances en la medicina moderna ya que permite el tratamiento efectivo de las infecciones causadas por microorganismos. Aunque estos compuestos han supuesto una mejora esencial en la calidad y la esperanza de vida humana, los agentes antimicrobianos han ido perdiendo eficacia debido a la aparición y diseminación de resistencias entre patógenos desde su uso extensivo en clínica. En este sentido, el número de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes va en aumento a nivel global.

Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, está ampliamente demostrado que los genes que confieren resistencia a los antibióticos y que están presentes en las bacterias patógenas actuales se han originado a través de eventos sucesivos de transferencia horizontal a partir de genes homólogos disponibles desde tiempos ancestrales en los microorganismos productores o en sus competidores naturales. En este sentido, la introducción clínica de los antibacterianos ha dibujado un escenario ideal para la rápida selección y proliferación de cepas resistentes. No obstante, el origen de la resistencia contra los agentes quimioterapéuticos, como las sulfamidas o el trimetoprim, es más difícil de elucidar. Dado que este tipo de compuestos han sido diseñados *in vitro*, resulta poco probable que los genes que confieren resistencia existieran antes de su producción y uso clínico. En este contexto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la identificación del origen de los genes que confieren resistencia clínica a las sulfamidas y al trimetoprim. A continuación, se detallan los objetivos específicos de este trabajo:

- i) Identificación y caracterización de nuevos genes codificados en elementos genéticos móviles que confieren resistencia a sulfamidas y trimetoprim.

OBJETIVOS

- ii) Determinación del origen cromosómico de las variantes genéticas móviles que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim.
- iii) Caracterización del perfil de resistencia a sulfamidas y trimetoprim de los orígenes cromosómicos de los genes móviles que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim.
- iv) Evaluación de los procesos evolutivos que gobiernan la emergencia y la diseminación de los genes que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Elucidación del origen cromosómico de las variantes genéticas móviles que confieren resistencia clínica a las sulfamidas

Origin of the Mobile Di-Hydro-Pteroate Synthase Gene Determining Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates

Sánchez-Osuna M, Cortés P, Barbé J, Erill I

Frontiers in Microbiology

La resistencia a las sulfamidas está ampliamente extendida en el entorno clínico y está mediada por los genes móviles *sul1*, *sul2*, *sul3* y *sul4* que codifican variantes funcionales de la enzima dihidropteroato sintasa, pero incapaces de unir compuestos de esta familia de antimicrobianos. Este tipo de resistencia es conocida desde los años cuarenta y a pesar de su importancia clínica su origen cromosómico aun no se ha identificado.

En el presente estudio se identificó una inserción de dos aminoácidos (motivo Sul) asociada a las proteínas codificadas por los genes *sul* y presentes en las dihidropteroato sintasa codificadas por el gen *folP* cromosómico de dos familias bacterianas: *Rhodobiaceae* (Proteobacteria) y *Leptospiraceae* (Spirochaetes). Adicionalmente se identificó, mediante genómica comparativa, un fragmento conservado del gen *glmM* codificado *downstream* de *sul2* en múltiples plásmidos, que es una disposición genética notoriamente conservada en el filo Proteobacteria.

RESULTADOS

La filogenia de las proteínas FolP/Sul y GlmM estableció claramente que los genes *sul1-2* y *sul3* se originaron como resultado de una movilización independiente de los genes *folP* de *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae*, respectivamente. Estos resultados fueron apoyados por la similitud del contenido GC entre *sul3* y el *folP* de *Leptospiraceae*, así como entre *sul1-2* y el *folP* de *Rhodobiaceae*. Además, la topología de la reconstrucción filogenética sugiere que estas movilizaciones fueron precedidas por un evento de transferencia lateral del *folP* de *Leptospiraceae* a miembros de la familia *Rhodobiaceae*.

En cuanto a la caracterización del perfil de resistencia a sulfamidas, los resultados indicaron que los genes *folP* de las familias *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae* confieren resistencia a sulfamidas, mientras que genes *folP* codificados en especies estrechamente relacionadas y que no poseen el motivo Sul no confieren resistencia. Estos resultados sugieren que el motivo Sul podría ser el responsable de la resistencia.



Origin of the Mobile Di-Hydro-Pteroate Synthase Gene Determining Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates

Miquel Sánchez-Osuna¹, Pilar Cortés¹, Jordi Barbé^{1*} and Ivan Erill^{2*}

¹ Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, ² Department of Biological Sciences, University of Maryland, Baltimore County, Baltimore, MD, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Laurent Poirer,
Université de Fribourg, Switzerland

Reviewed by:

Jose L. Martinez,
Spanish National Research
Council (CSIC), Spain
Rune Henning Sorum,
Norwegian University of Life Sciences,
Norway

*Correspondence:

Jordi Barbé
jordi.barbe@uab.cat
Ivan Erill
erill@umbc.edu

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 14 September 2018

Accepted: 21 December 2018

Published: 10 January 2019

Citation:

Sánchez-Osuna M, Cortés P,
Barbé J and Erill I (2019) Origin of the
Mobile Di-Hydro-Pteroate Synthase
Gene Determining Sulfonamide
Resistance in Clinical Isolates.
Front. Microbiol. 9:3332.
doi: 10.3389/fmicb.2018.03332

Sulfonamides are synthetic chemotherapeutic agents that work as competitive inhibitors of the di-hydro-pterolate synthase (DHPS) enzyme, encoded by the *folP* gene. Resistance to sulfonamides is widespread in the clinical setting and predominantly mediated by plasmid- and integron-borne *sul1-3* genes encoding mutant DHPS enzymes that do not bind sulfonamides. In spite of their clinical importance, the genetic origin of *sul1-3* genes remains unknown. Here we analyze *sul* genes and their genetic neighborhoods to uncover *sul* signature elements that enable the elucidation of their genetic origin. We identify a protein sequence Sul motif associated with *sul*-encoded proteins, as well as consistent association of a phosphoglucosamine mutase gene (*glmM*) with the *sul2* gene. We identify chromosomal *folP* genes bearing these genetic markers in two bacterial families: the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae*. Bayesian phylogenetic inference of FolP/Sul and GlmM protein sequences clearly establishes that *sul1-2* and *sul3* genes originated as a mobilization of *folP* genes present in, respectively, the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae*, and indicate that the *Rhodobiaceae folP* gene was transferred from the *Leptospiraceae*. Analysis of %GC content in *folP/sul* gene sequences supports the phylogenetic inference results and indicates that the emergence of the Sul motif in chromosomally encoded FolP proteins is ancient and considerably predates the clinical introduction of sulfonamides. *In vitro* assays reveal that both the *Rhodobiaceae* and the *Leptospiraceae*, but not other related chromosomally encoded FolP proteins confer resistance in a sulfonamide-sensitive *Escherichia coli* background, indicating that the Sul motif is associated with sulfonamide resistance. Given the absence of any known natural sulfonamides targeting DHPS, these results provide a novel perspective on the emergence of resistance to synthetic chemotherapeutic agents, whereby preexisting resistant variants in the vast bacterial pangenome may be rapidly selected for and disseminated upon the clinical introduction of novel chemotherapeutics.

Keywords: sulfonamide, resistance, antibiotic, phylogeny, mobile element, integron, plasmid

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is a pressing problem in modern healthcare (Carlet et al., 2014; Rossolini et al., 2014). Bacterial cells present several mechanisms to cope with exposure to antibiotics or chemotherapeutic agents, which may be acquired through mutation or, most frequently, via lateral gene transfer on mobile genetic elements (Davies and Davies, 2010). These mechanisms include modification of the antimicrobial target, degradation or chemical modification of the antimicrobial molecule, targeted reduction of antimicrobial uptake, active export of the antimicrobial through efflux pumps and use of alternate pathways and enzymes (Davies and Davies, 2010).

It is widely accepted that many antibiotic resistance genes present today in pathogenic bacteria originated from homologs evolved over eons in either the microbes that naturally produce the antibiotics or their natural competitors (Aminov and Mackie, 2007). When coupled with the high plasticity of bacterial genomes and their co-existence with a large variety of genetic mobile elements, the availability of a readily evolved pool of antibiotic resistance genes set the stage for the rapid proliferation of multi-resistant strains in the clinical setting shortly after the commercial introduction of antibiotics (Aminov and Mackie, 2007). In contrast, the origins of resistance against chemotherapeutic agents are harder to pinpoint. Since these were designed *in vitro*, it seems unlikely that a large pool of genes conferring resistance to chemotherapeutic agents existed before their introduction. After their discovery in the 1960's, resistance to quinolones was initially rare and limited to chromosomal mutations in DNA gyrase, topoisomerase IV or efflux pumps (Hooper, 1999). However, in the early 2000's plasmid-borne *qnr* genes were first detected and spread rapidly to clinical pathogens. *Qnr* is a member of the pentapeptide repeat family and was shown to confer resistance by binding to DNA gyrase and limiting the effect of quinolone drugs. The origin of plasmid-borne *qnr* genes has been traced to environmental homologs and these are thought to have derived from genes originally targeting antibiotics, such as microcin B17 (Tran and Jacoby, 2002).

Aryl sulfonamides are synthetic antibacterial compounds presenting a structure similar to para-amino benzoic acid (PABA), and containing a sulfonamide group linked to an aromatic group. Commonly referred to as sulfonamides or sulfa drugs due to their clinical relevance, synthetic aryl sulfonamides function as competitive inhibitors of the di-hydro-pterolate synthase (DHPS) enzyme, encoded in bacteria by the *folP* gene (Sköld, 2000). DHPS participates in folate synthesis using PABA as a substrate, and the competitive inhibition of DHPS by sulfonamides results in growth arrest (Mitsuhashi, 1993; Sköld, 2000). Experiments in mice in the 1930's demonstrated the effectiveness of sulfonamide against bacteria, and sulfonamide became the first antibacterial chemotherapeutic to be used systemically (Domagk, 1935; Aminov, 2010). It remained in use throughout World War II, but by the end of the 1940's resistant strains started to emerge and sulfonamides were rapidly displaced in favor of the newly discovered antibiotics (Sköld, 2000; Davenport, 2012).

Resistance to sulfonamide through increased production of PABA was reported in the early 1940's (Landy et al., 1943), but the most commonly reported mechanism of sulfonamide resistance are mutations to the chromosomal *folP* gene (Huovinen et al., 1995; Sköld, 2000). Mutations to the chromosomal *folP* gene have been shown to provide varying degrees of trade-off between resistance and efficient folate synthesis, decreasing DHPS affinity for sulfonamide while maintaining or increasing its affinity for PABA (Sköld, 2000). These mutations have occurred independently in multiple bacterial genera and target multiple conserved areas of the DHPS protein (Sköld, 2000). However, similar mutational profiles, such as two-amino acid insertions in *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*, have been reported (Rådström et al., 1992; Haasum et al., 2001), and in both these genera there is evidence of extensive recombination within *folP* genes (Fermer et al., 1995; Swedberg et al., 1998).

In spite of the multiple instances of chromosomal *folP* resistant variants, clinical resistance to sulfonamides is predominantly plasmid-borne and mediated by *sul* genes encoding alternative sulfonamide-resistant DHPS enzymes (Sköld, 2000). Four different *sul* genes have been described to date, with *sul1* and *sul2* being the predominant forms in clinical isolates (Rådström et al., 1991). The *sul1* gene is typically found in class 1 integrons and linked to other resistance genes (Rådström et al., 1991), whereas *sul2* is usually associated to non-conjugative plasmids of the IncQ group (Enne et al., 2001) and to large transmissible plasmids like pBP1 (Treck et al., 1981). The *sul3* gene was characterized in the *Escherichia coli* conjugative plasmid pVP440. It was shown to be flanked by two copies of the insertion element IS15 Δ /26 and to be widespread in *E. coli* isolates from pigs in Switzerland (Perreten and Boerlin, 2003). Recently, a *sul4* gene was identified in a systematic prospection of class 1 integron-borne genes in Indian river sediments, but this *sul* variant has not yet been detected in clinical isolates. Genomic context analyses revealed that the *sul4* gene had been recently mobilized and phylogenetic inference pinpointed its putative origin as part of the folate synthesis cluster in the Chloroflexi phylum (Razavi et al., 2017).

Despite the importance of sulfonamides in human and animal therapy, the putative origin of the three *sul* genes that account for the vast majority of reported clinical resistance to sulfonamide remains to be elucidated. In this work we leverage comparative genomics, phylogenetic analysis and *in vitro* determination of minimal inhibitory concentrations (MIC) of sulfamethoxazole to unravel the origin of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes. Our analysis indicates that chromosomally encoded *folP* genes conferring resistance to sulfonamide originated in members of the *Leptospiraceae* family and were transferred to the Alphaproteobacteria *Rhodobiaceae* family more than 500 million years ago. These isolated sources of chromosomally encoded sulfonamide-resistant DHPS were mobilized independently, leading to the broadly disseminated *sul1*, *sul2*, and *sul3* resistance genes. Our results hence indicate that resistance to synthetic chemotherapeutic agents may be available in the form of chromosomally encoded variants among the extremely diverse bacterial domain, and can be rapidly disseminated upon the release of novel synthetic drugs.

MATERIALS AND METHODS

Data Collection

FoIP, GlmM, and Sul1-3 homologs were identified in complete GenBank sequences (GenBank, RRID:SCR_002760) through BLASTP (BLASTP, RRID:SCR_001010) (Altschul et al., 1997) using the *E. coli* FoIP (WP_000764731) and GlmM (WP_000071134) proteins as the query. Putative homologs were detected as BLASTP hits passing stringent *e*-value ($<1e-20$) and query coverage (75%) thresholds. FoIP and GlmM chromosomally encoded proteins were identified on a representative genome of all bacterial orders with complete genome assemblies on RefSeq (RefSeq, RRID:SCR_003496), of each bacterial family for the Proteobacteria, of any bacterial species where chromosomally encoded sulfonamide resistance mutants had been reported, and on all available complete genomes for clades of interest (*Rhodobiaceae*, Spirochaetes, and Chlamydiae) (Supplementary Table S1). All protein coding gene sequences for these genomes were downloaded for %GC analysis. Sul proteins encoded by mobile *sul* genes were identified on complete plasmid, transposon, and integron GenBank sequences (GenBank, RRID:SCR_002760).

Identification and Visualization of Sul-Like Signatures in FoIP Sequences

To identify sequence motifs associated with Sul proteins, we performed a CLUSTALW alignment (Clustal Omega, RRID:SCR_001591) using a non-redundant ($<99\%$ identity) subset of the Sul1-3 homologous sequences detected previously and FoIP sequence sampled from each bacterial clade. Following visual inspection of the resulting alignment, a Sul-like motif conserved in several chromosomally encoded FoIP proteins was visualized using iceLogo (iceLogo, RRID:SCR_012137) (Colaert et al., 2009) and a consensus motif was derived and encoded into a PROSITE-format pattern (PROSITE, RRID:SCR_003457). The inferred PROSITE pattern was used to seed a Pattern Hit Initiated BLAST (NCBI PHI-BLAST; RRID:SCR_004870) search against the NCBI non-redundant Protein database (Protein, RRID:SCR_003257) using as a query the protein sequences of Sul1-3 reported in the literature (WP_001336346, WP_010890159, and WP_000034420) and conservative *e*-value ($<1e-20$) and query coverage (75%) limits. Only chromosomal hits with the identified signature characteristic of *sul* gene products were retained for further analysis.

Multiple Sequence Alignment and Phylogenetic Inference

For phylogenetic inference, multiple sequence alignments of identified FoIP/Sul1-3 and GlmM homologous sequences were performed with CLUSTALW (Clustal Omega, RRID:SCR_001591) (Thompson et al., 1994) using variable (5, 10, and 25) gap opening penalties. These alignments were then integrated with local LALIGN alignments with T-COFFEE (T-Coffee, RRID:SCR_011818) (Notredame et al., 2000), and the resulting alignment was trimmed using the “less stringent selection” parameters of the Gblocks online

service (Castresana, 2000; Dereeper et al., 2008). Bayesian phylogenetic inference on trimmed alignments was performed with MrBayes (MrBayes, RRID:SCR_012067) (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Four Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo runs with four independent chains were carried out for 30,000,000 generations, and the resulting consensus tree was plotted with FigTree (FigTree, RRID:SCR_008515).

DNA Sequence Analyses

Analysis of %GC in synonymous and non-synonymous patterns and K_a/K_s divergence were performed according to the Nei–Gojobori computation method (Nei and Gojobori, 1986) and the standalone PAL2NAL program for codon-based alignments (Suyama et al., 2006), using custom Python scripts for pipelining. Analyses of %GC content were performed on all sampled bacterial genomes, computing genome-wide %GC statistics and comparing them to *foIP* estimates. Analyses of K_a/K_s divergence were performed on pair-wise alignments of the N- and C-terminal ends of the *glmM* gene sequence of all sampled bacterial groups. One-sided Mann–Whitney *U*-tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad, RRID:SCR_002798) to determine whether differences between *foIP* and chromosomal %GC content were significantly different in the presence and absence of Sul-like signature motifs, and whether the N- and C-terminal regions presented different mutational profiles. The scripts used for the analysis are available at the GitHub ErillLab repository. Nucleotide sequence identities percentages were computed on gapless positions of PAL2NAL codon-based alignments using a custom Python script. Amelioration times were estimated using the Ameliorator program (Lawrence and Ochman, 1997) under different selection modes. K_a and K_s values were estimated from pairwise alignments of orthologs between the *Parvibaculum lavamentivorans* and *Leptospira interrogans* genomes as determined by the OMA Orthology database (OMA Orthology database, RRID:SCR_016425) (Altenhoff et al., 2018) and species divergence times were inferred from published molecular clock phylogenies (Battistuzzi et al., 2004).

Cloning, Transformation and Complementation of the *foIP* Gene for Broth Microdilution Assays

The *L. interrogans* serovar Lai str. 56601 *foIP* and *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX *foIP* gene were synthesized and adapted to *E. coli* codon usage at ATG:biosynthetics GmbH, Germany; whereas *P. lavamentivorans* DS-1 (DSMZ 13023) and *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (gently provided by Professor S. Kaplan; Health Science Center, University of Texas) *foIP* genes were amplified from genomic DNA. The *sul2* gene was amplified from the RSF1010 plasmid (Kushner, 1978; Honda et al., 1991) and used as a positive control. The *foIP/sul* genes were amplified using suitable primers (Supplementary Table S2), purified PCR products were then digested with NdeI and BamHI (New England Biolabs, RRID:SCR_013517) and cloned into a dephosphorylated pUA1108 vector (Mayola et al., 2014), previously cut with the same restriction enzymes. The

ligation was introduced by transformation into competent *E. coli* DH5 α cells and recombinant plasmids were extracted with the NZYMiniprep kit (NZYTech, RRID:SCR_016772), sequenced (Macrogen, RRID:SCR_014454) and introduced by transformation in competent *E. coli* K-12 (CGSC 5073) (CGSC, RRID:SCR_002303). Susceptibility to sulfamethoxazole (Sigma-Aldrich, RRID:SCR_008988) for the strains containing the *folP/sul* genes was determined using broth microdilution tests in Mueller-Hinton broth (MH) with half serial dilutions of sulfamethoxazole ranging from 512 to 0.125 mg/L, following the CLSI guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Colonies were grown on Luria-Bertani (LB) agar for 18 h and then suspended in sterile 0.9% NaCl solution to a McFarland 0.5 turbidity level. These suspensions were diluted at 10^{-2} in Mueller-Hinton (MH) broth, and 50 μ l (5.10^4 cells) were inoculated onto microtiter plates containing 50 μ l of MH broth supplemented with 1024–0.250 mg/L of sulfamethoxazole. To determine growth, absorbance at 550 nm was measured after 24 h incubation at 37°C (Sunrise plate reader; Tecan Life Sciences, RRID:SCR_016771).

RESULTS

Identification of Putative Chromosomal Origins for *sul1-3* Genes

To identify putative chromosomal homologs of *sul1-3* genes, we performed a multiple sequence alignment including any protein sequences with at most 90% similarity to those encoded by *sul1-3* genes reported in the literature and by chromosomal *folP* genes from a representative of each bacterial order. Inspection of the resulting alignment (Figure 1A and Supplementary Data 1) revealed the presence of a two-amino acid insertion in proteins encoded by *sul1-3* genes that is not present in those encoded by *sul4* or the analyzed chromosomal *folP* genes. This two-amino acid insertion is located in a conserved region of the FolP protein (residues R171-N211 of the *E. coli* FolP protein [WP_000764731]) that presents other signature changes in *sul*-encoded proteins with respect to chromosomally encoded FolP proteins (Figures 1A,B and Supplementary Data 1) (Rådström and Swedberg, 1988; Morgan et al., 2011). We derived a PROSITE-format pattern (PROSITE, RRID:SCR_003457) (Supplementary Data 2) of the identified Sul motif to seed a Pattern Hit Initiated BLAST (NCBI PHI-BLAST; RRID:SCR_004870) search against the NCBI non-redundant (NR) protein database (NCBI, RRID:SCR_006472). This search identified several proteins encoded by *Rhodobiaceae* family members that presented a similar insertion pattern. BLASTP (BLASTP, RRID:AB_141607) searches with these *Rhodobiaceae* FolP sequences matched proteins in several members of the *Leptospiraceae* and the *Chlamydiae*. However, analysis of the resulting multiple sequence alignment showed that only the *Leptospiraceae* FolP protein sequences displayed the identified two-amino acid insertion pattern (Supplementary Data 3). Heretofore, we refer to these chromosomally encoded FolP proteins containing the

signature Sul motif as FolP*, and to their encoding gene as *folP**.

In order to gain further insight into the possible chromosomal origins of *sul* genes, we performed tBLASTX searches against the NCBI RefSeq Genome Database (RefSeq, RRID:SCR_003496) using the genetic surroundings (5,000 bp) of *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes with at most 90% similarity to those reported in the literature (Supplementary Table S3). This search did not return consistent results for the *sul1* and *sul3* genetic surroundings, but it identified a conserved gene fragment encoding the N-terminal region of the phosphoglucosamine mutase GlmM protein downstream of *sul2* in multiple plasmids harboring this resistance gene. These *sul2*-associated GlmM sequences lack the entire GlmM C-terminal region, including three of its functional domains (Mehra-Chaudhary et al., 2011), and it can therefore be safely assumed that they are not functional as phosphoglucosamine mutases. This genetic arrangement has been reported previously as a feature of *sul2* isolates (Kehrenberg and Schwarz, 2005; Hu et al., 2016), and it is strongly conserved in the genomic surroundings of chromosomal *folP* genes in the Gammaproteobacteria, the Betaproteobacteria and several Alphaproteobacteria lineages (Figure 1C). Analysis of the *folP* genetic surroundings in complete genomes of the Spirochaetes and the Alphaproteobacteria shows clear differences between the genes coding for the identified *Rhodobiaceae* and *Leptospiraceae* FolP* proteins harboring the two-amino acid insertion pattern and those without it (Figure 1C). The *Leptospiraceae* show a conserved arrangement with *folP** flanked by a peptidoglycan-associated lipoprotein and a tetratricopeptide repeat-containing domain protein, whereas in most other Spirochaetes *folP* is flanked by a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase and a diadenylate cyclase. In contrast, the Alphaproteobacteria yield several distinct syntenic regions for *folP*. In the *Rhodobiaceae*, *folP** is flanked by genes coding for either a FtsH-family metalloproteinase or a TetR-family transcriptional repressor and the phosphoglucosamine mutase *glmM*. In the *Rhodobacterales*, *folP* is flanked by a dihydroneopterin aldolase and *glmM*, but in the *Rhizobiales* it is flanked by a Zn-dependent protease and the dihydroneopterin aldolase. This last arrangement, in which the dihydroneopterin aldolase is followed by a 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase is also part of the genetic surroundings of *folP* in most Actinobacteria (Figure 1C).

Phylogenetic Analysis of *sul/folP* and *glmM* Genes

The presence of a signature two-amino acid insertion characteristic of *sul* gene products in chromosomally encoded FolP* proteins and the identification of a genetic environment for *sul2* genes that is conserved in multiple bacterial genomes suggested that it might be possible to pinpoint the evolutionary origin of *sul* genes. To further investigate this possibility, we performed a rigorous phylogenetic analysis of FolP/Sul protein sequences. We sampled a representative genome of all bacterial orders with complete genome assemblies, of each

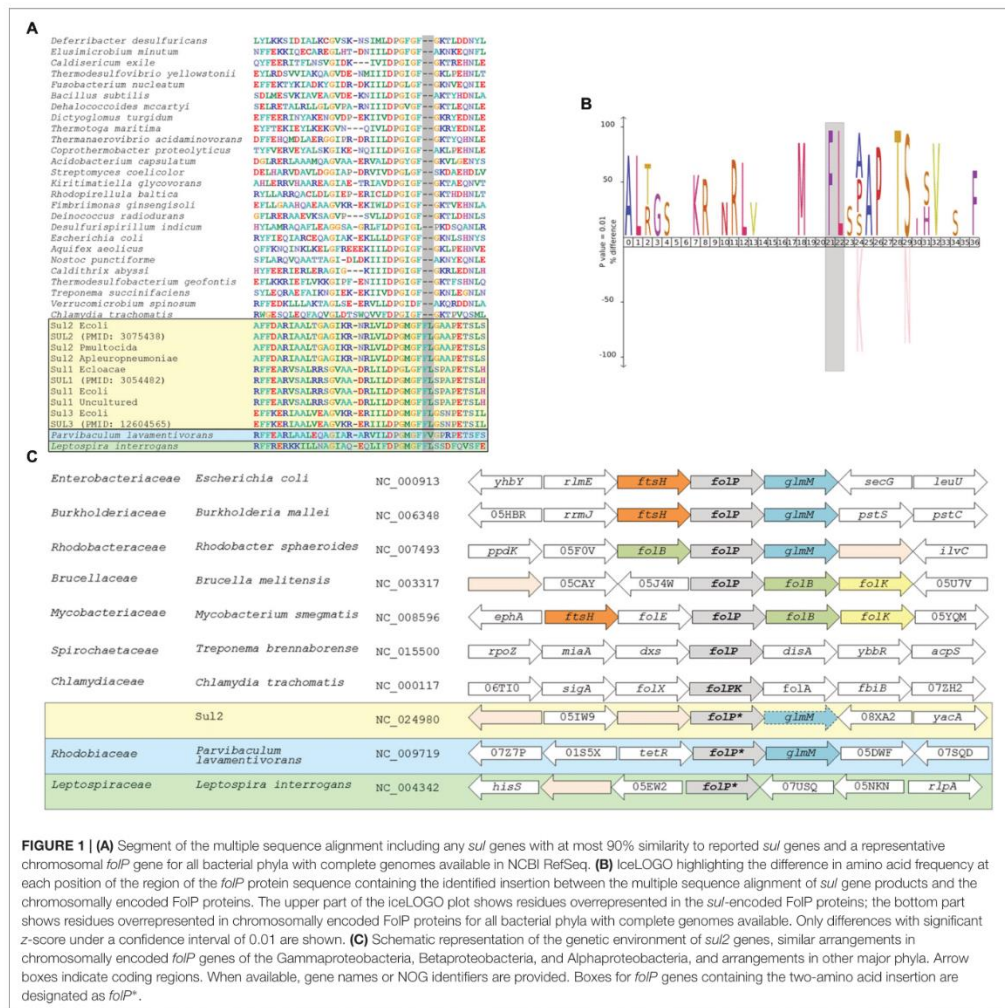
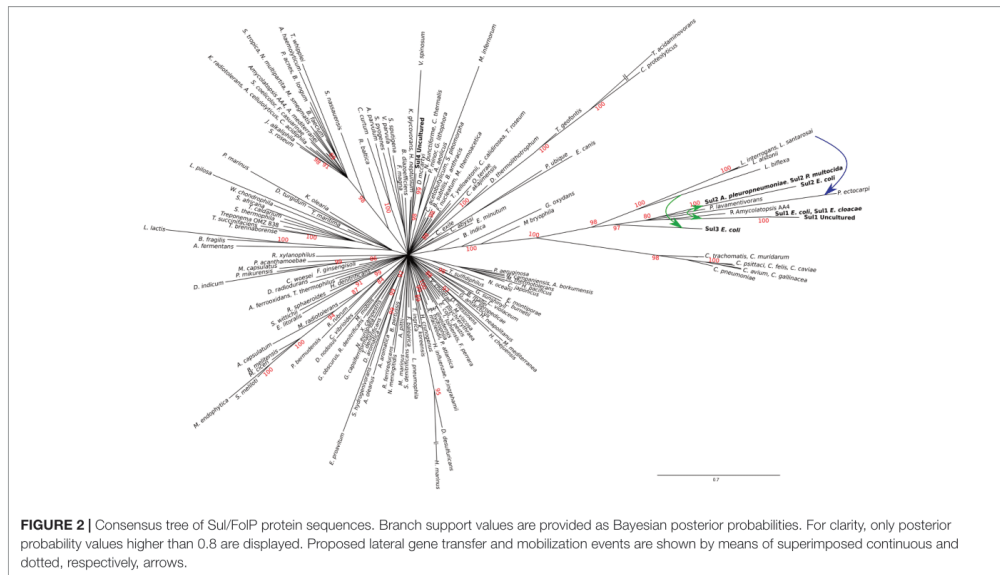


FIGURE 1 | (A) Segment of the multiple sequence alignment including any *sul* genes with at most 90% similarity to reported *sul* genes and a representative chromosomal *folP* gene for all bacterial phyla with complete genomes available in NCBI RefSeq. **(B)** iceL-LOGO highlighting the difference in amino acid frequency at each position of the region of the *folP* protein sequence containing the identified insertion between the multiple sequence alignment of *sul* gene products and the chromosomally encoded *FolP* proteins. The upper part of the iceL-LOGO plot shows residues overrepresented in the *sul*-encoded *FolP* proteins; the bottom part shows residues overrepresented in chromosomally encoded *FolP* proteins for all bacterial phyla with complete genomes available. Only differences with significant z-score under a confidence interval of 0.01 are shown. **(C)** Schematic representation of the genetic environment of *sul2* genes, similar arrangements in chromosomally encoded *folP* genes of the Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, and Alphaproteobacteria, and arrangements in other major phyla. Arrow boxes indicate coding regions. When available, gene names or NOG identifiers are provided. Boxes for *folP* genes containing the two-amino acid insertion are designated as *folP**.

bacterial family for the Proteobacteria and all available complete genomes for clades of interest (*Rhodobiaceae*, Spirochaetes, and Chlamydiae), and we identified chromosomally encoded *FolP* homologs in each of these genomes using BLASTP (BLASTP, RRID:SCR_001010) with the *E. coli* *FolP* protein as a query. We used a distance tree generated with CLUSTALW (Clustal Omega, RRID:SCR_001591) to identify and discard a set of protein sequences from duplicated *folP* genes in the Actinobacteria (Supplementary Data 4), and we performed multiple sequence alignment and Bayesian phylogenetic reconstruction of the remaining *FolP/Sul* sequences with T-COFFEE (T-Coffee,

RRID:SCR_011818) and MrBayes (MrBayes, RRID:SCR_012067) (Supplementary Data 5).

The resulting tree (Figure 2) provides strong support for the hypothesis that *sul1-3* genes originated in the *Rhodobiaceae* and *Leptospiaceae* families. In particular, the topology inferred by MrBayes suggests that the *Leptospiaceae folP** gene gave rise to both *sul3* and the *folP** gene encountered in the *Rhodobiaceae*, most likely through a lateral gene transfer event in an ancestor of this Alphaproteobacteria family. According to the reconstructed *FolP* phylogeny, the *Rhodobiaceae folP** gene was subsequently mobilized as *sul2*, and later evolved into the



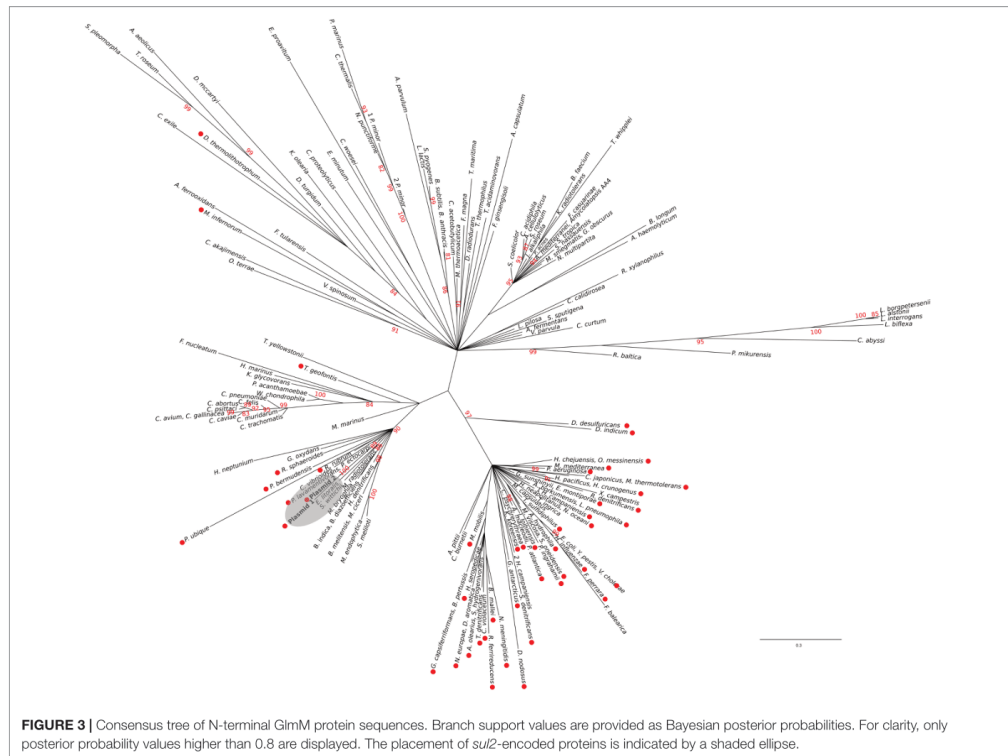
integron-borne *sul1* gene (Orman et al., 2002). The fact that the *Leptospiraceae* FolP* sequences branch independently of other Spirochaetes sequences and immediately after the Chlamydiae suggests that the *Leptospiraceae* folP* gene might have originated as a result of lateral gene transfer event from the Chlamydiae, and that it subsequently incorporated the signature two-amino acid insert present in *sul*-encoded DHPS proteins. Importantly, the trimmed multiple sequence alignment used for FolP/Sul Bayesian phylogenetic inference (Supplementary Data 5) does not incorporate the two-amino acid insertion of the Sul motif, indicating that the joint branching of Sul1-3 sequences with chromosomally encoded *Rhodobiaceae* and *Leptospiraceae* FolP proteins is based on sequence similarity beyond this insertion and its immediate vicinity (Figures 1A,B).

The existence of a genetic environment for *sul2* genes conserved in bacterial chromosomes provides the means to independently assess the likelihood of the evolutionary scenario inferred from the FolP phylogeny. Using the same sampling methods utilized for *sul1*/folP protein products, we collected protein sequences for phosphoglucosamine mutase (GlmM) homologs and performed Bayesian phylogenetic inference on the aligned N-terminal regions. The resulting GlmM tree (Figure 3) provides further support for a *Rhodobiaceae* origin of the *sul2* gene, with the *sul2*-associated GlmM sequences branching with the *Rhodobiaceae* GlmM protein sequences deep within an otherwise monophyletic Alphaproteobacteria clade. Taken together, the consistent branching with the *Rhodobiaceae* of the protein sequences encoded by both *sul2* and its accompanying *glmM* gene fragment firmly establish this Alphaproteobacteria family as the chromosomal origin for the *sul2* gene. The

phylogenetic evidence thus indicates that the *sul2* gene was excised with the N-terminal fragment of the *glmM* gene during the mobilization event that led to their incorporation into plasmid vectors. Given that the *folP-glmM* arrangement is only seen in the Proteobacteria, this also excludes the possibility that the *sul2* gene was mobilized directly from a *Leptospiraceae* background, where the *folP* gene presents an unrelated, yet conserved, genomic environment (Figure 1C).

Analysis of *sul*/*folP* and *glmM* Gene Sequences

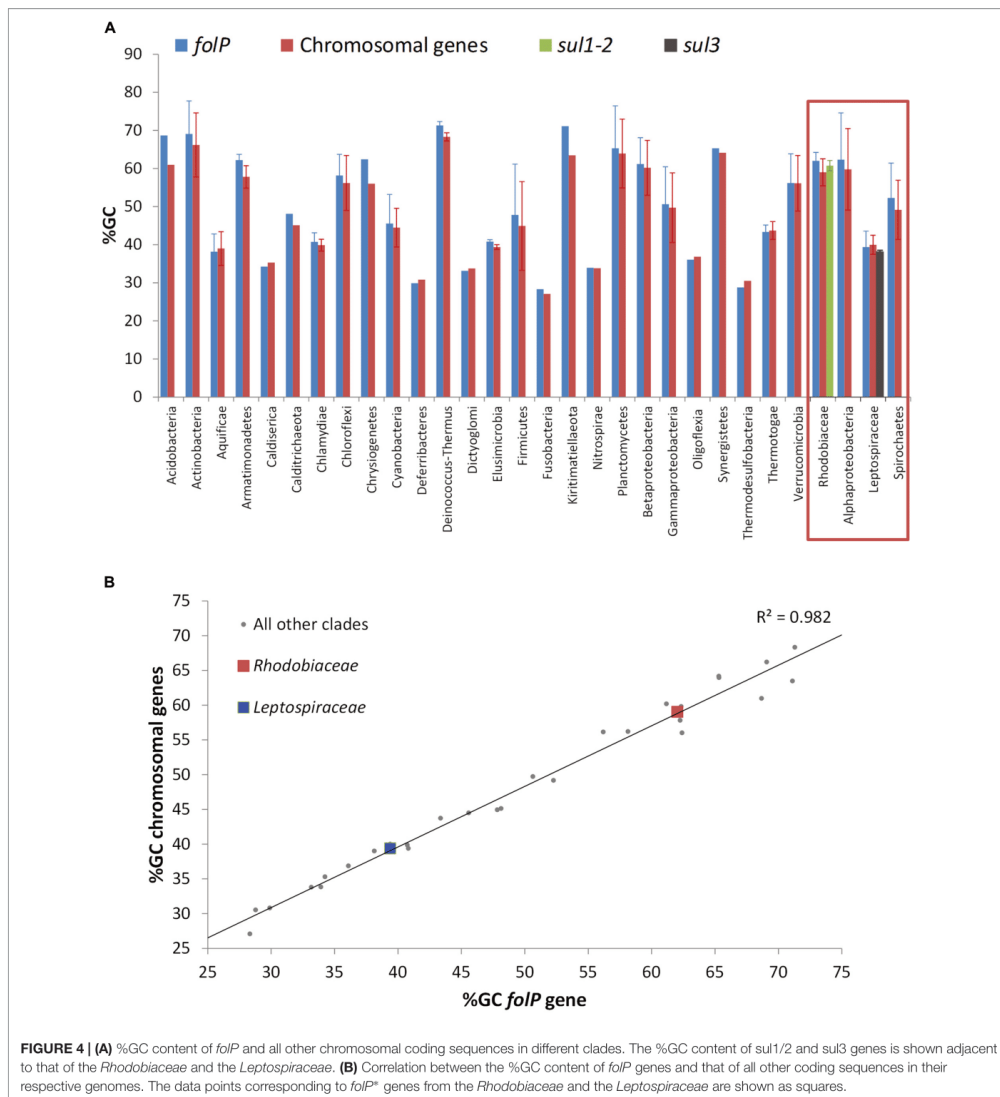
The phylogenetic analysis of FolP and GlmM sequences puts forward an evolutionary scenario wherein the *Leptospiraceae* folP* was transferred to the members of the *Rhodobiaceae* family before being mobilized independently into the *sul3*- and *sul1/2*-harboring mobile genetic elements reported in sulfonamide-resistant clinical isolates. To further investigate this hypothesis, we undertook a systematic analysis of *folP* and *glmM* coding sequences. We compiled *folP* gene sequences for all the FolP proteins included in the phylogenetic analysis (Figure 2), as well as any *sul* gene sequences with less than 90% identity to those reported in the literature and any chromosomal *folP** genes encoding a DHPS with the signature Sul motif (Figure 1A) for which there were at least 1 Mbp of whole genome shotgun sequence data (Supplementary Data 6). We computed the overall and codon-position %GC content on both the *folP/sul* coding sequences and all the available coding sequences in their respective genome assembly (Supplementary Table S4). The %GC content data (Figure 4A)



reveals that *sul1/2* sequences have a high %GC content (60.76 SD ± 1.42) that is consistent with their origin as mobilized *Rhodobiaceae folP** sequences (%GC content: 62.02 SD ± 2.22). Similarly, *sul3* sequences display a %GC content (38.14 SD ± 0.55) consistent with their mobilization from a *Leptospiraceae folP** background (39.39 SD ± 4.17). This similarity in %GC content precludes the dating of these mobilization events through analysis of DNA amelioration rates. However, examination of DNA sequence similarity (Table 1) reveals identity values of 50–60% between the posited chromosomal donors and their mobile counterparts. These values are in the lower range of sequence identities for previously described mobilization events (Table 1), and hence point to an early mobilization of *folP** genes that is consistent with the almost universal association of *sul* genes with class 1 mobile integrons (Lévesque et al., 1995). Together with the phylogenetic inference results, these data provide strong support for an independent mobilization of *sul1/2* and *sul3* genes from, respectively, *Rhodobiaceae* and *Leptospiraceae* family chromosomal backgrounds.

The independent mobilization of *sul1/2* and *sul3* is underpinned by a preceding lateral gene transfer of *folP**

from the *Leptospiraceae* into a *Rhodobiaceae* ancestor. In this context, the substantial divergence in %GC content between the chromosomal *folP** genes of both clades indicates a long process of amelioration. In fact, statistical analysis of the differences in codon position %GC content between *folP* genes and all available coding sequences in their respective genomes shows that *Leptospiraceae* and *Rhodobiaceae folP** genes encoding proteins with the Sul motif cannot be distinguished from other *folP* genes (one-sided Mann–Whitney *U*-test $p > 0.05$ for GC1, GC2, and GC3) (Figure 4B) (Supplementary Table S4). We used Ameliorator (Lawrence and Ochman, 1997) to estimate the time required for the observed amelioration via forward simulation from *Leptospiraceae* codon position %GC values. Even under assumptions of fast evolutionary change, the software provides a lower bound of 476 million years for the observed amelioration of the *Leptospiraceae folP** gene into the *Rhodobiaceae* one. Statistical analysis of synonymous and non-synonymous mutation patterns in the N- and C-terminal regions of the *glmM* gene also shows that mutation patterns in each region of the *Rhodobiaceae glmM* gene are indistinguishable from those observed in other *glmM* genes (one-sided Mann–Whitney *U*-test $p > 0.05$). Since the *glmM* gene fragment associated to



sul2 genes is likely to be non-functional and subject to genetic drift, the absence of diverging substitution patterns between the N- and C-terminal regions of *Rhodobiaceae glmM* sequences indicates that the *glmM* and *sul2* genes were transferred from the *Rhodobiaceae* to *sul2*-harboring vectors, and not vice versa (Supplementary Table S5). Lastly, given that gene loss is much more likely than gain (Kannan et al., 2013), the absence of *glmM*

fragments in *sul1* isolates supports in turn the notion that *sul1* derived from *sul2*. This is consistent with the branching pattern observed in the *FolP/Sul* tree (Figure 2) and the observed DNA identity values (Table 1), which define a scenario of independent mobilization of *sul3* from the *Leptospiraceae* and *sul2* from the *Rhodobiaceae*, with the subsequent uptake of *sul1* by class 1 integrons.

TABLE 1 | Percent GC content and nucleotide identity between posited chromosomal donors and the corresponding mobilized resistance genes for a number of antibiotics.

	Putative donor	%GC	Mobile determinant	%GC	% Identity	PMID
Sulfonamide	<i>Leptospira interrogans</i>	32.62	<i>Salmonella enterica</i> <i>sul3</i> (WP_117344859.1)	37.75	51.91	(This work)
	<i>Leptospiaceae</i>	39.39 ± 4.17	<i>sul3</i> group	38.14 ± 0.55	49.73 ± 1.55	(This work)
	<i>Spirochaetales</i>	52.22 ± 9.24	<i>sul3</i> group	38.14 ± 0.55	47.28 ± 2.63	(This work)
	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	64.48	<i>Pasteurella multocida</i> <i>sul2</i> (WP_010890206.1)	60.61	63.33	(This work)
	<i>Rhodobiaceae</i>	62.02 ± 2.22	<i>sul2</i> group	59.6 ± 2.70	60.46 ± 2.37	(This work)
	<i>Alphaproteobacteria</i>	62.34 ± 13.20	<i>sul2</i> group	59.6 ± 2.70	48.14 ± 3.28	(This work)
	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	64.48	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>sul1</i> (AFB76381.1)	61.78	54.65	(This work)
	<i>Rhodobiaceae</i>	62.02 ± 2.22	<i>sul1</i> group	61.72 ± 0.09	54.06 ± 0.51	(This work)
	<i>Alphaproteobacteria</i>	62.34 ± 13.20	<i>sul1</i> group	61.72 ± 0.10	46.50 ± 3.48	(This work)
	Vancomycin	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	64.86	<i>vanX</i>	64.59	76.57
Quinolones	<i>Shewanella</i> algae	53.12	<i>qnrA</i>	53.27	95.6	16048974
	<i>Vibrio splendidus</i>	44.44	<i>qnrS</i>	43.99	72.78	17452482
β-lactams	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	54.02	<i>CTX-M-1</i>	54.11	99.3	11709346
	<i>Kluyvera ascorbata</i>	56.62	<i>CTX-M-2</i>	56.73	99.2	12183268
	<i>Kluyvera georgiana</i>	57.07	<i>CTX-M-8</i>	57.08	98.5	12435721
	<i>Kluyvera georgiana</i>	57.64	<i>CTX-M-9</i>	60.5	99	15855541
	<i>Kluyvera georgiana</i>	57.53	<i>CTX-M-25</i>	57.99	95.9	20421403

Groups of homologs for *sul* genes correspond to sequences with at most 90% similarity to reported *sul* genes. For each donor clade and target group, the most likely mapping is shown. Where appropriate, the PubMed identifier (PMID) for the reference establishing the correspondence between putative chromosomal donor and mobile resistance determinant is provided.

Sulfonamide Resistance of Chromosomal *folP* Genes

Phylogenetic and sequence analysis results indicate that chromosomal *folP** genes encoding proteins with the signature Sul motif were independently mobilized into the *sul1-3*-harboring mobile elements found in sulfonamide-resistant clinical isolates, but they do not address whether the presence of this motif is associated with sulfonamide resistance. To investigate this possibility, we cloned the *folP* gene coding for DHPS in the *Rhodobiaceae* *P. lavamentivorans* DS-1 (WP_012111048), the *Leptospiaceae* *L. interrogans* serovar Lai str. 56601 (WP_000444207), the *Rhodobacteraceae* *R. sphaeroides* 2.4.1 (WP_011337038) and the *Chlamydiae* *C. trachomatis* D/UW-3/CX (WP_009871981). Following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003), we then performed broth microdilution assays to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of sulfamethoxazole. The results shown in **Table 2** reveal that both *P. lavamentivorans* and *L. interrogans* chromosomal *folP** genes confer resistance to sulfamethoxazole in an *E. coli* strain sensitive to sulfonamides. These data are in agreement with previous reporting of sulfonamide resistance in multiple *L. interrogans* strains (Chakraborty et al., 2010, 2011; Wuthiekanun et al., 2015), and suggest that the observed resistance was likely due to mutations in the *Leptospiaceae* chromosomal *folP** gene rather than to the presence of plasmid-borne *sul* genes. Moreover, our results show that complementation with *folP* genes from another Alphaproteobacteria family lacking the Sul motif, the *Rhodobacteraceae*, does not confer resistance to sulfamethoxazole. These results reveal that the chromosomal *folP** genes that gave rise to *sul* genes are capable

of conferring resistance to sulfonamide in *E. coli*. In contrast with the *Leptospiaceae* and the *Rhodobiaceae* *folP** genes, the chromosomal *folKP* gene of the *Chlamydiae*, which encodes a DHPS lacking the Sul motif, does not confer resistance to sulfamethoxazole (**Table 2**). This is in agreement with abundant reports of sulfonamide susceptibility in several *Chlamydia* species (Hammerschlag, 1982; Fan et al., 1992; Sandoz and Rockey, 2010; Marti et al., 2018). Since the *Chlamydiae* *folKP* gene is the most closely related chromosomal *folP* gene to the cluster encompassing the *sul* genes and the *Leptospiaceae* and the *Rhodobiaceae* *folP** (**Figure 2**), the lack of resistance in *Chlamydiae* *folKP* genes strongly suggests that changes in the region encompassing the Sul motif may be responsible for the observed resistance. This region is located in a connector loop within the N-terminal ‘pole’ of the eight-stranded α/β barrel of DHPS, which is involved in sulfonamide recognition (Rådström and Swedberg, 1988; Morgan et al., 2011). The two-amino acid insertion might hence result in decreased affinity for sulfonamide by locally disrupting folding, as has been proposed previously for similar insertions in chromosomal *folP* genes (Achari et al., 1997).

DISCUSSION

Prevalence of Sulfonamide Resistance in Ancestral Bacteria

The evidence presented here converges toward an evolutionary scenario in which *sul1-3* genes from clinical isolates derive from ancestral chromosomal mutations in the *folP** gene of the *Leptospiaceae* and the *Rhodobiaceae* (**Figure 5**). The emergence and maintenance of a sulfonamide-resistant *folP** gene in the

TABLE 2 | Broth microdilution assays.

	Sulfamethoxazole (mg/L)
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073	8
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108	8
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108:: <i>folP</i> _{PI}	>512
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108:: <i>folP</i> _{LI}	512
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108:: <i>folKP</i> _{Ct}	4
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108:: <i>folP</i> _{RS}	8
<i>Escherichia coli</i> CGSC5073 pUA1108:: <i>sul2</i>	>512

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of sulfamethoxazole in wild-type *Escherichia coli* CGSC5073 carrying different versions of pUA1108::*folP*; PI, *Parvibaculum lavamentivorans*; LI, *Leptospira interrogans*; Ct, *Chlamydia trachomatis*; RS, *Rhodobacter sphaeroides*.

Leptospiraceae and its subsequent transfer to the *Rhodobiaceae* suggests that it might have conveyed some selective advantage prior to the introduction of sulfonamides, but the advent of mutations providing significant resistance to sulfonamide and their subsequent spread could also have been fortuitous. In both scenarios, formally variants of an evolutionary exaptation process (Gould and Vrba, 1982), a resistance-causing mutation may arise and be maintained in the population in the absence of direct antibiotic selection. Upon the clinical introduction of the relevant antibiotic, selection favors the rapid spread of the resistance determinant.

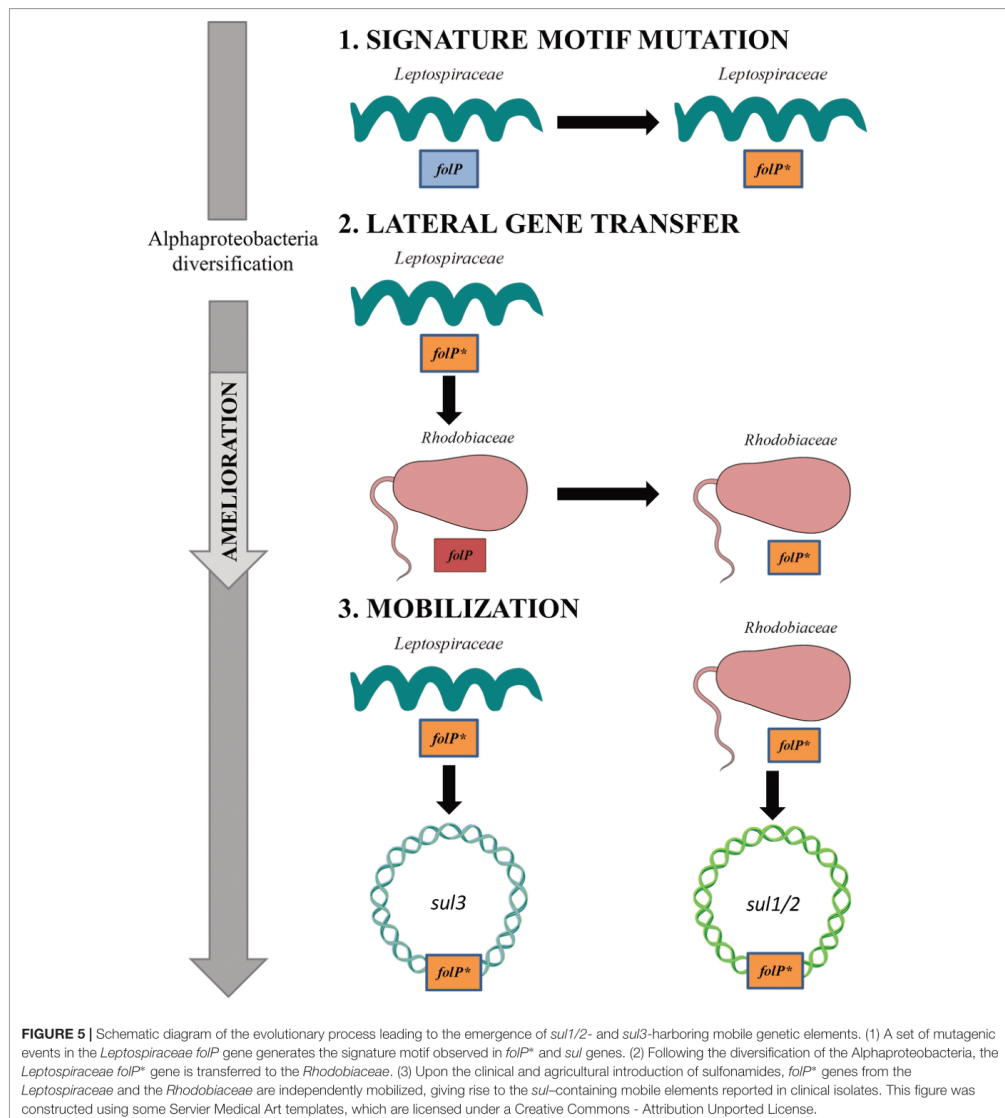
The emergence and maintenance of resistance against synthetic chemotherapeutic agents prior to their clinical deployment may hence reside in the evolution of resistance as a side-effect of mutations providing some other fitness benefit. A case in point is the evolution and rapid mobilization via plasmid-borne *qnr* genes of resistance to quinolones (Nordmann and Poirel, 2005). *Qnr* proteins bind to DNA gyrase, the target of quinolones, early in the gyrase catalytic cycle and decrease binding of quinolones to the enzyme-DNA complex (Tran et al., 2005). Other members of the pentapeptide repeat family are known to bind DNA gyrase and provide some level of quinolone resistance (Hegde et al., 2005). Conversely, *qnr*-encoded proteins can provide cross-protection against naturally occurring antibiotics and synthetic agents targeting DNA gyrase (Hooper and Jacoby, 2016). The likely chromosomal origins of *qnrA* and *qnrS* genes have been traced to water-borne isolates of, respectively, *Shewanella algae* and *Vibrio splendidus* (Cantón, 2009) (Table 1). It has been hypothesized that these ancestral *qnr* genes and other pentapeptide repeat family members may have evolved to provide resistance against other compounds targeting DNA gyrase, such as the plasmid-borne microcin B17 (Heddle et al., 2001), as elements facilitating or modulating the normal function of DNA gyrase (Aminov and Mackie, 2007) or as functional components of the adaptation of *Shewanella* species to cold environments (Kim et al., 2011). In this context, the sequence determinants associated with chromosomal *folP*^{*} genes may have originally enhanced PABA binding or another aspect of folate biosynthesis (Sköld, 2000), provided protection against hitherto unknown antibiotics targeting DHPS, or fulfilled an unrelated function.

The emergence and persistence of mutations conferring resistance against chemotherapeutic agents prior to their discovery may also have taken place in the absence of selection for the resistance-conferring mutations. The appearance of sulfonamide-resistance mutations in chromosomal *folP* genes has been amply documented (Huovinen et al., 1995; Sköld, 2000), and these were in fact the primary drivers of sulfonamide resistance following the introduction of sulfa drugs (Sköld, 2000). Furthermore, it has been documented that the presence of sulfonamide resistant DHPS does not necessarily impose a fitness cost on bacteria (Enne et al., 2004). Structural studies have suggested that most sulfonamide resistance mutations act by modulating accessibility of sulfonamides to the PABA-binding pocket without hindering PABA binding (Baca et al., 2000; Morgan et al., 2011). It is hence conceivable that naturally occurring mutations conferring resistance to sulfonamide might not be selected against in the absence of this chemotherapeutic agent. Subsequent complementary changes to adjust the affinity for PABA of the altered DHPS molecule may have resulted in fixation of the original mutations conferring resistance to sulfonamide (Andersson, 2006).

Alternatively, sulfonamide resistance mutations in *folP* may have arisen and persisted in response to naturally occurring sulfonamides produced by competing organisms. Sulfonamides are rare in nature, with only eight known natural sulfonamides reported to date (Petkowski et al., 2018). Of these, only two naturally occurring sulfonamides are aryl sulfonamides, produced in very small amounts by recombinant *Streptomyces* species harboring the complete xiamycin biosynthesis gene cluster (Baunach et al., 2015). Although these sulfonamides show potent antimicrobial activity, their bulky substitution pattern suggests that their mode of action and molecular target are likely different from synthetic aryl sulfonamides (Baunach et al., 2015).

Mobilization of Ancestral Resistance Reservoirs

The phylogenetic inference and genomic analysis results reported in this work uphold an evolutionary scenario wherein chromosomally encoded sulfonamide resistant *folP* variants were independently mobilized from *Leptospiraceae* and *Rhodobiaceae* backgrounds, and that mobile *folP*^{*} genes subsequently spread very rapidly following the clinical introduction of synthetic aryl sulfonamides, giving rise to the *sul1/2* and *sul3* genes routinely detected in clinical isolates (Figure 5). The rapid mobilization and dissemination of genes conferring resistance to antibiotic and chemotherapeutic agents upon the clinical or agricultural use of these compounds has been amply documented (Aminov and Mackie, 2007; Stokes and Gillings, 2011). Mobilization and spread may be mediated by plasmids encoding transposons and integrons, as well as integrative and conjugative elements, mobile pathogenicity islands and bacteriophages, but the common tenet is that sustained exposure of bacterial populations to antibiotics or chemotherapeutic agents induces a strong selective pressure to elicit the mobilization of resistance determinants (Stokes and Gillings, 2011).



Together with penicillin and tetracycline, sulfonamides have been the antibacterial agents most frequently used at sub-therapeutic levels in livestock production (Franco et al., 1990), and it has been reported that sulfonamides have higher mobility, lower removal efficiency and deeper environmental penetration than most other antibacterial agents

(Kumar et al., 2005). The widespread and intensive use of sulfonamides in agriculture, aquaculture and animal husbandry since the mid 1960's, and their persistence in soil, sediments and subterranean aquatic communities where *Leptospiraceae* and *Rhodobiaceae* abound, provides an ample window of opportunity for the spread of chromosomally encoded or already

mobilized *folP*^{*} genes within these bacterial communities and the subsequent transfer of these mobile resistance determinants to other bacterial clades.

Recent mobilization from a Chloroflexi chromosomal *folP* background has been postulated as the likely origin of the *sul4* gene (Razavi et al., 2017), and this result is in agreement with the phylogenetic analysis reported here (Figure 2). In the case of the chromosomal *folP*^{*} genes identified here and their mobilization into *sul*-harboring resistance vectors, several sources of evidence provide additional support for the frequent mobilization of chromosomal *folP* genes. For instance, phylogenetic evidence (Figure 2) indicates that the *Rhodobiaceae folP*^{*} was incorporated at some point by the Actinobacterium *Amycolatopsis*, which harbors three *folP* orthologs (Supplementary Data 7). Similarly, a plasmid broadly distributed among *Azospirillum* isolates (e.g., AP010951, FQ311873), a member of the *Rhodospirillaceae* Alphaproteobacteria family, contains a *folP* gene flanked by genes coding for a flagellar export pore protein (FlhB) and the full length phosphoglucosamine mutase (GlmM) (Supplementary Data 7). This *folP* does not contain the signature two-amino acid insertion, indicating that its mobilization occurred independently of those leading to *sul1/2* genes.

More significantly, a partial genomic sequence from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate (LLMY01000073.1) harbors a *folP*^{*} gene with high sequence and genetic neighborhood similarity to the *Rhodobiaceae P. lavamentivorans* DS-1 (van Belkum et al., 2015). The genes immediately upstream and downstream of this *P. aeruginosa folP*^{*}, which contains the Sul motif, encode a TetR family regulator and a partial phosphoglucosamine mutase (GlmM) protein (Supplementary Data 7). These three genes are flanked by IS91 and ISL3 family transposases. Importantly, the IS91 transposase contains similar sequence motifs and shares termini identity with ISCR elements, which are present in both *sul1* and *sul2*-harboring plasmids (Toleman et al., 2006; Toleman and Walsh, 2011). Moreover, this *P. aeruginosa folP*^{*} presents 72.76% nucleotide identity with the *P. lavamentivorans folP*^{*}, which is significantly higher than the one observed between *P. lavamentivorans folP*^{*} and *sul2* (Table 1). It is hence highly likely that the *P. aeruginosa folP*^{*} represents an intermediate step or an independent mobilization of the *Rhodobiaceae folP*^{*}.

Taken together, the protein sequence phylogeny and genomic context evidence (Figures 1–3), the absence of Sul-containing motifs in any other chromosomal *folP* genes (Figure 1), the tight alignment in %GC content between the different chromosomal *folP*^{*} and mobile *sul* genes (Figure 4), and the identification of multiple *folP* mobilization events consistently point toward an independent mobilization from *Leptospiraceae* and *Rhodobiaceae* chromosomal backgrounds that gave rise to, respectively, *sul3* and *sul2/1* genes. The close similarity in %GC content between the putative donor and mobilized sequences (Figure 4), and the lack of suitable models for sequence evolution in mobile elements make it difficult to estimate precisely the timing of this mobilization using sequence analysis methods. The relatively low nucleotide sequence identity between the *Leptospiraceae* and *Rhodobiaceae* chromosomal *folP*^{*} genes and *sul* genes (Table 1) suggests that *folP*^{*} genes were mobilized and diversified long

before the clinical introduction of sulfonamides. Nonetheless, extensive recombination and unusual selection pressures on mobile elements could in principle also account for the observed sequence divergence within a shorter timescale. What seems abundantly clear is that shortly after the clinical introduction of sulfonamides, *sul* genes spread rapidly on a variety of mobile elements, as attested by the well-established association between *sul* genes and integrons (Lévesque et al., 1995; Davies, 2007).

Metagenomics analysis and prospective studies of preserved ancient environments, such as permafrost and remote cave habitats, have largely displaced the notion that antibiotic resistance emerges in response to anthropogenic antibiotic use (D'Costa et al., 2011; Bhullar et al., 2012; Perron et al., 2015; Crofts et al., 2017). These studies have conclusively shown that antibiotic resistance predates the use of antibiotics by humans, and that it is widely distributed across the bacterial pangenome. In a few isolated cases, resistance determinants for synthetic chemotherapeutic agents that predate or have rapidly arisen upon human use has been documented, but their existence can be attributed to cross-resistance to naturally occurring antibiotics [e.g., microcin B17 for quinolones (Tran and Jacoby, 2002), sisomicin for amikacin (Perron et al., 2015)]. The identification in this work of ancient chromosomal mutations in *folP* conferring resistance to sulfonamide as the likely origins of the *sul1-3* genes present in sulfonamide-resistant clinical isolates puts forward an alternative scenario. Given the absence of known naturally occurring aryl sulfonamides targeting DHPS, our results suggest that resistance to novel synthetic chemotherapeutic agents may be already available in the vast microbial pangenome, and that its global dissemination can take place in a very short amount of time upon the clinical introduction of novel chemotherapeutic compounds.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets used in this study can all be freely accessed at the NCBI GenBank/RefSeq databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). All scripts used for analysis can be obtained at the GitHub ErillLab repository (<https://github.com/ErillLab/>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS-O and IE performed the *in silico* analyses. MS-O and IE developed scripts for genomic analyses and ran phylogenetic inference methods. MS-O and PC performed the *in vitro* analyses. IE and JB conceived the experiments and coordinated the research. IE and MS-O drafted the manuscript. All authors discussed the findings and interpreted the results.

FUNDING

This work was supported by grant BIO2016-77011-R from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad to JB.

MS-O was the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España.

A preprint version of this manuscript prior to peer review is available on bioRxiv (<https://doi.org/10.1101/472472>).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Joan Ruiz and Susana Escribano for their technical support during some of the experimental procedures, as well as Júlia López for her continued support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03332/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., Rosemond, J., and Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat. Struct. Biol.* 4, 490–497. doi: 10.1038/nsb0697-490
- Altenhoff, A. M., Glover, N. M., Train, C.-M., Kaleb, K., Warwick Vesztrocy, A., Dylus, D., et al. (2018). The OMA orthology database in 2018: retrieving evolutionary relationships among all domains of life through richer web and programmatic interfaces. *Nucleic Acids Res.* 46, D477–D485. doi: 10.1093/nar/gkx1019
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 1:134. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134
- Aminov, R. I., and Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 147–161. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x
- Andersson, D. I. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 461–465. doi: 10.1016/j.mib.2006.07.002
- Baca, A. M., Sirawaraporn, R., Turley, S., Sirawaraporn, W., and Hol, W. G. (2000). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J. Mol. Biol.* 302, 1193–1212. doi: 10.1006/jmbi.2000.4094
- Battistuzzi, F. U., Feijao, A., and Hedges, S. B. (2004). A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evol. Biol.* 4:44. doi: 10.1186/1471-2148-4-44
- Baunach, M., Ding, L., Willing, K., and Hertweck, C. (2015). Bacterial synthesis of unusual sulfonamide and sulfone antibiotics by flavoenzyme-mediated sulfur dioxide capture. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54, 13279–13283. doi: 10.1002/anie.201506541
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., et al. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7:e34953. doi: 10.1371/journal.pone.0034953
- Cantón, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15(Suppl. 1), 20–25. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x
- Carlet, J., Rambaud, C., and Pulcini, C. (2014). Save antibiotics: a call for action of the world alliance against antibiotic resistance (WAAAR). *BMC Infect. Dis.* 14:436. doi: 10.1186/1471-2334-14-436
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Chakraborty, A., Miyahara, S., Villanueva, S. Y. A. M., Gloriani, N. G., and Yoshida, S. (2010). In vitro sensitivity and resistance of 46 leptospira strains isolated from rats in the philippines to 14 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5403–5405. doi: 10.1128/AAC.00973-10
- Chakraborty, A., Miyahara, S., Villanueva, S. Y. A. M., Saito, M., Gloriani, N. G., and Yoshida, S. (2011). A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol. Immunol.* 55, 494–501. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Approved Standard*, 6 Edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colaert, N., Helsens, K., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2009). Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. *Nat. Methods* 6, 786–787. doi: 10.1038/nmeth1109-786
- Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., and Dantas, G. (2017). Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 422–434. doi: 10.1038/nrmicro.2017.28
- Davenport, D. (2012). The war against bacteria: how were sulphonamide drugs used by Britain during World War II? *Med. Human.* 38, 55–58. doi: 10.1136/medhum-2011-010024
- Davies, J. (2007). Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8, 616–621. doi: 10.1038/sj.embor.7401022
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457. doi: 10.1038/nature10388
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469. doi: 10.1093/nar/gkn180
- Domagk, G. (1935). Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 61, 250–253. doi: 10.1055/s-0028-1129486
- Enne, V. I., Bennett, P. M., Livermore, D. M., and Hall, L. M. C. (2004). Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p123 in the absence of selective pressure. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 958–963. doi: 10.1093/jac/dkh217
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., and Hall, L. M. C. (2001). Persistence of sulfonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357, 1325–1328. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04519-0
- Fan, H., Brunham, R. C., and McClarty, G. (1992). Acquisition and synthesis of folates by obligate intracellular bacteria of the genus *Chlamydia*. *J. Clin. Invest.* 90, 1803–1811. doi: 10.1172/JCI116055
- Fermer, C., Kristiansen, B. E., Sköld, O., and Swedberg, G. (1995). Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species. *J. Bacteriol.* 177, 4669–4675. doi: 10.1128/jb.177.16.4669-4675.1995
- Franco, D. A., Webb, J., and Taylor, C. E. (1990). Antibiotic and sulfonamide residues in meat: implications for human health. *J. Food Prot.* 53, 178–185. doi: 10.4315/0362-028X-53.2.178
- Gould, S. J., and Vrba, E. S. (1982). Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8, 4–15. doi: 10.1017/S0094837300004310
- Haasum, Y., Ström, K., Wehlie, R., Luna, V., Roberts, M. C., Maskell, J. P., et al. (2001). Amino acid repetitions in the dihydropteroate synthase of *Streptococcus pneumoniae* lead to sulfonamide resistance with limited effects on substrate Km. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 805–809. doi: 10.1128/AAC.45.3.805-809.2001
- Hammerschlag, M. R. (1982). Activity of trimethoprim-sulfamethoxazole against *Chlamydia trachomatis* in vitro. *Rev. Infect. Dis.* 4, 500–505. doi: 10.1093/cid/4.2.500
- Heddle, J. G., Blance, S. J., Zamble, D. B., Hollfelder, F., Miller, D. A., Wentzell, L. M., et al. (2001). The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison:

- characterisation of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* 307, 1223–1234. doi: 10.1006/jmbi.2001.4562
- Hegde, S. S., Vetting, M. W., Roderick, S. L., Mitchenall, L. A., Maxwell, A., Takiff, H. E., et al. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308, 1480–1483. doi: 10.1126/science.1110699
- Honda, Y., Sakai, H., Hiasa, H., Tanaka, K., Komano, T., and Bagdasarian, M. (1991). Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 179–183. doi: 10.1073/pnas.88.1.179
- Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist. Update* 2, 38–55. doi: 10.1054/drup.1998.0068
- Hooper, D. C., and Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6:a025320. doi: 10.1101/cshperspect.a025320
- Hu, L. F., Xu, X. H., Yang, H. F., Ye, Y., and Li, J. B. (2016). Role of sul2 gene linked to transposase in resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Ann. Lab. Med.* 36, 73–75. doi: 10.3343/alm.2016.36.1.73
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., and Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 279–289. doi: 10.1128/AAC.39.2.279
- Kannan, L., Li, H., Rubinstein, B., and Mushegian, A. (2013). Models of gene gain and gene loss for probabilistic reconstruction of gene content in the last universal common ancestor of life. *Biol. Direct* 8:32. doi: 10.1186/1745-6150-8-32
- Kehrenberg, C., and Schwarz, S. (2005). dfrA20, A novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 414–417. doi: 10.1128/AAC.49.1.414-417.2005
- Kim, H. B., Park, C. H., Gavin, M., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. (2011). Cold shock induces qnrA expression in shewanella algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 414–416. doi: 10.1128/AAC.00991-10
- Kumar, K., Gupta, S. C., Chander, Y., and Singh, A. K. (2005). Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Adv. Agron.* 87, 1–54. doi: 10.1016/S0065-2113(05)87001-4
- Kushner, S. R. (1978). "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids," in *Genetic Engineering*, eds H. W. Boyer and S. Nicosia (Amsterdam: Elsevier), 17–23.
- Landy, M., Larkum, N. W., Oswald, E. J., and Streightoff, F. (1943). Increased synthesis of p-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 97, 265–267. doi: 10.1126/science.97.2516.265
- Lawrence, J. G., and Ochman, H. (1997). Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J. Mol. Evol.* 44, 383–397. doi: 10.1007/PL00006158
- Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., and Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 185–191. doi: 10.1128/AAC.39.1.185
- Marti, H., Borel, N., Dean, D., and Leonard, C. A. (2018). Evaluating the antibiotic susceptibility of chlamydia – New approaches for in vitro assays. *Front. Microbiol.* 9:1414. doi: 10.3389/fmicb.2018.01414
- Mayola, A., Irazoki, O., Martínez, I. A., Petrov, D., Menolascina, F., Stocker, R., et al. (2014). RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 9:e105578. doi: 10.1371/journal.pone.0105578
- Mehra-Chaudhary, R., Mick, J., and Beamer, L. J. (2011). Crystal structure of *Bacillus anthracis* phosphoglucosamine mutase, an enzyme in the peptidoglycan biosynthetic pathway? *J. Bacteriol.* 193, 4081–4087. doi: 10.1128/JB.00418-11
- Mitsuhashi, S. (1993). Drug resistance in bacteria: history, genetics and biochemistry. *J. Int. Med. Res.* 21, 1–14. doi: 10.1177/030006059302100101
- Morgan, R. E., Batot, G. O., Dement, J. M., Rao, V. A., Eadsforth, T. C., and Hunter, W. N. (2011). Crystal structures of *Burkholderia cenocepacia* dihydropteroate synthase in the apo-form and complexed with the product 7,8-dihydropteroate. *BMC Struct. Biol.* 11:21. doi: 10.1186/1472-6807-11-21
- Nei, M., and Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3, 418–426. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410
- Nordmann, P., and Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 463–469. doi: 10.1093/jac/dki245
- Notredame, C., Higgins, D. G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
- Orman, B. E., Piñero, S. A., Arduino, S., Galas, M., Melano, R., Caffer, M. I., et al. (2002). Evolution of multidrug resistance in nontyphoid *salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3963–3970. doi: 10.1128/AAC.46.12.3963-3970.2002
- Perreten, V., and Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1169–1172. doi: 10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003
- Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G., et al. (2015). Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS One* 10:e0069533. doi: 10.1371/journal.pone.0069533
- Petkowski, J. J., Bains, W., and Seager, S. (2018). Natural products containing a Nitrogen-Sulfur bond. *J. Nat. Prod.* 81, 423–446. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00921
- Rådström, P., Fermér, C., Kristiansen, B. E., Jenkins, A., Sköld, O., and Swedberg, G. (1992). Transformational exchanges in the dihydropteroate synthase gene of *Neisseria meningitidis*: a novel mechanism for acquisition of sulfonamide resistance. *J. Bacteriol.* 174, 6386–6393. doi: 10.1128/jb.174.20.6386-6393.1992
- Rådström, P., and Swedberg, G. (1988). RSF1010 and a conjugative plasmid contain sulII, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1684–1692. doi: 10.1128/AAC.32.11.1684
- Rådström, P., Swedberg, G., and Sköld, O. (1991). Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1840–1848. doi: 10.1128/AAC.35.9.1840
- Razavi, M., Marathe, N. P., Gillings, M. R., Flach, C.-F., Kristiansson, E., and Joakim Larsson, D. G. (2017). Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome* 5:160. doi: 10.1186/s40168-017-0379-y
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., and Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 18, 56–60. doi: 10.1016/j.coph.2014.09.006
- Sandoz, K. M., and Rockey, D. D. (2010). Antibiotic resistance in chlamydiae. *Future Microbiol.* 5, 1427–1442. doi: 10.2217/fmb.10.96
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Update* 3, 155–160. doi: 10.1054/drup.2000.0146
- Stokes, H. W., and Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 790–819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x
- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* 34, W609–W612. doi: 10.1093/nar/gkl315
- Swedberg, G., Ringertz, S., and Sköld, O. (1998). Sulfonamide resistance in streptococcus pyogenes is associated with differences in the amino acid sequence of its chromosomal dihydropteroate synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1062–1067. doi: 10.1128/AAC.42.5.1062
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673

- Toleman, M. A., Bennett, P. M., and Walsh, T. R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316. doi: 10.1128/MMBR.00048-05
- Toleman, M. A., and Walsh, T. R. (2011). Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 912–935. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x
- Tran, J. H., and Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5638–5642. doi: 10.1073/pnas.082092899
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 118–125. doi: 10.1128/AAC.49.1.118-125.2005
- Trecek, U., van Schmidt, F., and Wiedemann, B. (1981). Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrob. Agents Chemother.* 19, 371–380. doi: 10.1128/AAC.19.3.371
- van Belkum, A., Soriaga, L. B., LaFave, M. C., Akella, S., Veyrieras, J.-B., Barbu, E. M., et al. (2015). Phylogenetic distribution of CRISPR-cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6:e01796-15. doi: 10.1128/mBio.01796-15
- Wuthiekanun, V., Amornchai, P., Langla, S., White, N. J., Day, N. P. J., Limmathurotsakul, D., et al. (2015). Antimicrobial disk susceptibility testing of *Leptospira* spp. using leptospira vanaporn wuthiekanun (LVW). *Agar Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 241–243. doi: 10.4269/ajtmh.15-0180

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Sánchez-Osuna, Cortés, Barbé and Erill. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3.2 Caracterización del origen cromosómico de los genes móviles que confieren resistencia clínica al trimetoprim

Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim

Sánchez-Osuna M, Cortés P, Llagostera M, Barbé J, Erill I

Microbial Genomics

En estudios previos (Sánchez-Osuna et al., 2019) se demostró que la resistencia clínica a las sulfamidas surgió hace millones de años sugiriendo que en el amplio pan-genoma bacteriano pueden existir también genes que confieran resistencia a compuestos quimioterapéuticos e incluso a antimicrobianos aún por desarrollar. Por consiguiente, en el presente estudio se analizó el origen genético de la resistencia clínica a otro compuesto quimioterapéutico, el trimetoprim. La resistencia al trimetoprim es común y está mediada por los genes móviles *dfr* que codifican versiones funcionales de la enzima dihidrofolato reductasa resistentes a este compuesto.

La exploración filogenética de las proteínas codificadas por el gen *folA* y por los homólogos que confieren resistencia al trimetoprim (*dfr*) permitió identificar cuatro nuevos genes *dfr* (*dfrA38-41*) que confieren resistencia *in vitro* al trimetoprim en *A. baumannii*. Este análisis filogenético, respaldado por estudios de genómica comparativa y de contenido GC, además permitió determinar el origen cromosómico de ciertos genes *dfr*. Así, se identificó el género *Fluviicola* como el origen putativo del gen *dfrA20*, el género *Alcanivorax* del gen *dfrA26*, el género *Flavobacterium* del gen *dfrA38*, el género *Acinetobacter* de los genes *dfrA39-41* y el género *Bacillus* como el origen de los genes *dfrD-K*. De modo que, al contrario que

RESULTADOS

las sulfamidas, se encontró evidencia de reiteradas movilizaciones que resultaron en las diferentes variantes de los genes *dfp* que confieren resistencia al trimetoprim.

Finalmente, los resultados *in vitro* indicaron que los genes *folA* identificados como origen de los genes móviles que confieren resistencia a trimetoprim, con excepción del gen *folA* codificado por *Acinetobacter*, confieren resistencia a trimetoprim. De este modo, el presente trabajo revela que la resistencia al trimetoprim puede ser anterior al uso clínico de este agente quimioterapéutico, pero al contrario a lo que ocurre con las sulfamidas, ciertas variantes con mutaciones seleccionadas por el uso extensivo del trimetoprim pueden ser movilizadas y diseminadas en el entorno clínico.

Exploration into the origins and mobilization of di-hydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim

Miquel Sánchez-Osuna¹, Pilar Cortés¹, Montserrat Llagostera¹, Jordi Barbé^{1†} and Ivan Erill^{2,*†}

Abstract

Trimethoprim is a synthetic antibacterial agent that targets folate biosynthesis by competitively binding to the di-hydrofolate reductase enzyme (DHFR). Trimethoprim is often administered synergistically with sulfonamide, another chemotherapeutic agent targeting the di-hydropteroate synthase (DHPS) enzyme in the same pathway. Clinical resistance to both drugs is widespread and mediated by enzyme variants capable of performing their biological function without binding to these drugs. These mutant enzymes were assumed to have arisen after the discovery of these synthetic drugs, but recent work has shown that genes conferring resistance to sulfonamide were present in the bacterial pangenome millions of years ago. Here, we apply phylogenetics and comparative genomics methods to study the largest family of mobile trimethoprim-resistance genes (*dfrA*). We show that most of the *dfrA* genes identified to date map to two large clades that likely arose from independent mobilization events. In contrast to sulfonamide resistance (*sul*) genes, we find evidence of recurrent mobilization in *dfrA* genes. Phylogenetic evidence allows us to identify novel *dfrA* genes in the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*, and we confirm their resistance phenotype *in vitro*. We also identify a cluster of *dfrA* homologues in cryptic plasmid and phage genomes, but we show that these enzymes do not confer resistance to trimethoprim. Our methods also allow us to pinpoint the chromosomal origin of previously reported *dfrA* genes, and we show that many of these ancient chromosomal genes also confer resistance to trimethoprim. Our work reveals that trimethoprim resistance predated the clinical use of this chemotherapeutic agent, but that novel mutations have likely also arisen and become mobilized following its widespread use within and outside the clinic. Hence, this work confirms that resistance to novel drugs may already be present in the bacterial pangenome, and stresses the importance of rapid mobilization as a fundamental element in the emergence and global spread of resistance determinants.

DATA SUMMARY

- Nucleotide and protein sequences analysed in this study have been downloaded from publicly available National Center for Biotechnology Information databases.
- The scripts used for data collection and analysis can be obtained at the GitHub ErillLab repository (<https://github.com/ErillLab/>).
- The Bayesian phylogenetic tree can be visualized online on iTOL (<https://itol.embl.de/tree/855674159451585133078>) [1].

INTRODUCTION

Bacterial resistance to antibacterial agents remains an increasingly challenging and global problem in modern health care [2, 3]. Bacterial cells display a diverse array of mechanisms to cope with exposure to antibacterial compounds, including modification or overexpression of the antibacterial target, efflux or reduction of antibacterial uptake and the use of alternate pathways [4]. Constant exposure to non-lethal concentrations of antibacterial agents may lead to the selection of partial resistance to antibiotics over relatively short time spans [5], and this evolution may be hastened by simultaneous exposure to multiple antibacterials [6]. However,

Received 27 April 2020; Accepted 08 September 2020; Published 24 September 2020

Author affiliations: ¹Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ²Department of Biological Sciences, University of Maryland, Baltimore County, Baltimore, MD, USA.

*Correspondence: Ivan Erill, erill@umbc.edu

Keywords: trimethoprim; antibiotics; chemotherapeutic agent; resistance; sulfonamides; phylogenetics; evolution.

Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; NCBI, National Center for Biotechnology Information; PABA, para-aminobenzoic acid.

†These authors share senior authorship.

Data statement: All supporting data, code and protocols have been provided within the article or through supplementary data files. Sixteen supplementary tables and five supplementary figures are available with the online version of this article.

000440 © 2020 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

the rapid proliferation of multidrug-resistant nosocomial pathogens in the last 50 years has not been driven by the independent evolution of resistance traits, but through the extensive dissemination of mobile genetic elements carrying resistance genes [4, 7]. It is widely accepted that most genes conferring resistance to antibiotics present in pathogenic bacteria were obtained by successive lateral gene transfer of homologues that originally evolved in the microbes that produce the antibiotic or in their natural competitors [7, 8]. The high plasticity of bacterial genomes, enabled by a large repertoire of mobile genetic elements, and the availability of a large pool of ancient antibiotic-resistance determinants, hence, set the stage for the rapid proliferation of antibiotic resistance, giving rise to multi-resistant clinical strains just a few years after the commercial introduction of antibiotics [7].

Synthetic chemotherapeutic agents predate antibiotics in the clinical setting, and continue to be used synergistically with antibiotics to treat microbial infections [9]. Following the initial discovery and clinical use of arsphenamine in 1907 [10], interest in chemotherapeutic agents quickly took off after the development of sulfa drugs in the 1930s [11]. The discovery of trimethoprim (a di-aminopyrimidine) was received with interest because, like sulfonamides, trimethoprim targets the bacterial synthesis of tetrahydrofolic acid, which is a necessary cofactor in the synthesis of thymine and purines [12]. Sulfonamides are structural analogues of para-aminobenzoic acid (PABA) and inhibit the synthesis of di-hydropteroate by competing with PABA for binding to the di-hydropteroate synthase (DHPS) enzyme, resulting in sulfonamide-bound di-hydropterin [13]. Trimethoprim is a structural analogue of di-hydrofolic acid, derived from di-hydropteroate. It acts by competitively binding to the di-hydrofolate reductase (DHFR) enzyme; hence, inhibiting the production of tetrahydrofolic acid [13, 14]. The synergistic use of trimethoprim and sulfonamides was expected to have a potent bactericidal effect by producing a serial blockade on the tetrahydrofolic acid pathway [12, 15].

Unlike antibiotics, chemotherapeutic agents are not produced by natural organisms, yet resistance to these novel drugs arose quickly after their mass-production and it is today pervasive among clinical isolates [7]. In the case of sulfonamides and trimethoprim, which are usually administered in tandem, resistance via chromosomal mutations to both chemotherapeutics was reported soon after their clinical introduction [13]. Chromosomal resistance to sulfonamides can occur through mutations yielding increased production of PABA [16] or, more commonly, via mutations to the chromosomal *folP* gene (encoding DHPS), which decrease the affinity of DHPS for sulfonamide without detriment to PABA binding [13, 17]. Such mutations have been reported in multiple bacterial groups and target different conserved regions of DHPS [13]. Similarly, chromosomal resistance to trimethoprim may arise via mutations that increase transcription of the *folA* gene (encoding DHFR) [18], or through mutations that decrease the affinity of DHFR for trimethoprim [13]. The vast majority of resistant clinical isolates to both sulfonamides and trimethoprim, however, are not due to chromosomal

Impact Statement

Antibiotic resistance is a pressing and global phenomenon. It is well established that resistance to conventional antibiotics emerged millions of years ago in either antibiotic-producing bacteria or their competitors. Resistance to synthetic chemotherapeutic agents cannot be explained by this paradigm, since these drugs are not naturally produced. Hence, resistance is assumed to have evolved rapidly following the clinical introduction of these drugs. Recently, we showed that resistance to one such drug, sulfonamide, evolved not recently, but millions of years ago, suggesting that the diversity of bacterial genomes may well contain genes conferring resistance to drugs yet to be developed. Here, we analyse the origin of resistance to trimethoprim, another chemotherapeutic agent developed in the 1960s. Using phylogenetic methods, we identify new variants of the trimethoprim-resistance genes that had not previously been reported, and we trace the chromosomal origins for a number of already known resistance variants. Our results show that resistance to trimethoprim is very diverse, and has originated both from recent mutations and from pre-existing ancient variants. These results stress the importance of gene mobilization mechanisms as the main drivers of the current antibiotic-resistance phenomenon.

mutations, but to the acquisition of resistance determinants on mobile genetic elements [13]. Parallel to their systematic combined use in both clinical and agricultural settings, genes conferring resistance to sulfonamides and trimethoprim are frequently found together on mobile elements, such as class 1 integrons [19] or conjugative plasmids [13, 20]. The mobile genes conferring resistance to sulfonamide are homologues of the chromosomally encoded *folP* gene and are collectively known as *sul* genes (for sulfonamide resistance). Mobile genes conferring resistance to trimethoprim are either homologues or functional analogues of the chromosomally encoded *folA* gene and are collectively known as *dfr* genes (for di-hydrofolate reductase) [17].

In spite of their frequent co-occurrence on mobile genetic elements, there are significant differences between the mobile genes conferring resistance to sulfonamides (*sul* genes) and trimethoprim (*dfr* genes). To date, only three *sul* gene classes have been described in clinical isolates [21], whereas more than 30 different *dfr* genes have been reported in clinically relevant strains [22]. Trimethoprim-resistance (*dfr*) genes have been further classified into two families (*dfrA* and *dfrB*). These two families encode evolutionarily unrelated proteins of markedly different sizes. Sequence similarity indicates that *dfrA* genes are homologues of the chromosomally encoded *folA* genes, whereas *dfrB* genes are functional analogues of unknown origin [23, 24]. Most *dfrA* genes follow a standard naming convention consisting of *dfrA* followed by a numerical

value indicating their discovery rank order. However, several *dfrA* genes first identified in Gram-positive bacteria, and thought at the time to be unrelated to the Gram-negative *dfrA* genes, were originally named following an alphabetical convention (*dfrC–K*). The disparity in genetic diversity among sulfonamide and trimethoprim mobile resistance determinants is suggestive of different evolutionary processes leading to the onset and spread of resistance to these two chemotherapeutic agents [13]. It was suggested that resistance to sulfonamide had arisen in a few isolated organisms and rapidly spread upon the introduction of sulfa drugs, whereas trimethoprim resistance had independently evolved, and had been subsequently mobilized multiple times [13].

Recently, we examined the origins of *sul* genes through comparative genomics, phylogenetic analysis and *in vitro* assays [25]. We identified a well-defined mutational signature in *sul*-encoded proteins with respect to chromosomally encoded *folP* genes, and we used this conserved motif to map the origins of *sul* genes in bacterial chromosomes. Our work revealed that the three groups of *sul* genes identified in clinical isolates originated in the *Leptospiraceae* and were transferred to the *Rhodobiaceae* more than 500 million years ago. These two ancient resistant determinants were later independently mobilized, and rapidly disseminated following the commercial introduction of sulfa drugs. By tracing the phylogenetic lineage of *sul* genes and demonstrating that these two bacterial families were resistant to sulfonamides long before their discovery and clinical use, our work indicated that resistance to novel drugs could very well pre-exist, and be ready for mobilization, within the vast bacterial pangenome. Here, we apply similar methods to examine the phylogenetic relationships among *dfrA* and chromosomally encoded *folA* genes. Our aim is to shed light on the evolutionary processes giving rise to mobile trimethoprim-resistance genes. Our work illustrates significant similarities and differences in the processes leading to the emergence and spread of trimethoprim- and sulfonamide-resistance determinants, reveals previously unreported clusters of *dfrA* genes, and suggests that systematic analyses of the bacterial pangenome may be of use in the design of novel antibacterials.

METHODS

Sequence data collection

To identify homologues of DfrA proteins, we first compiled a panel of Dfr proteins reported in the literature. Dfr proteins belong to two distinct families of unrelated sequences (DfrA and DfrB; Fig. S1, available with the online version of this article). We mapped these sequences to PFAM models of DfrA (PF00186) and DfrB (PF06442) (Table S1) using HMMER version 3.1b2 (hmmScan) [26], and we discarded sequences mapping to the DfrB family, retaining only DfrA proteins for analysis (Table S2). We further excluded redundant DfrA sequences (amino acid sequence identity >90%) using T-COFFEE version 11.00.8cbe486 seq_reformat command [27], and used the resulting non-redundant panel to identify DfrA homologues in protein records associated with National

Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank/RefSeq sequences corresponding to mobile genetic elements. These were defined as sequences containing the keywords 'plasmid', 'integron' or 'transposon' in their title, belonging to complete genome records [28, 29]. Protein records corresponding to BLASTP hits matching stringent value ($<1e^{-20}$) and query coverage (>75%) thresholds were added to the panel if non-redundant (amino acid sequence identity <90% with respect to existing panel members), and their classification as mobile elements was validated by assessing that the nucleotide record encoding them contained at least one gene encoding an integrase, transposase or plasmid replication protein, as determined by HMMER (hmmScan, E value $<1e^{-05}$) with reference PFAM models (Table S3) [30–34]. To detect putative chromosomally encoded *folA* genes associated with mobile *dfrA* genes, we used the sequences in the extended non-redundant panel of DfrA homologues as queries for TBLASTN searches against NCBI GenBank complete genomes with stringent E value ($<1e^{-40}$) and query coverage (>75%) settings. Hits with nearby genes annotated as resistance determinants, transposases or integrases were considered to encode chromosomally integrated mobile DfrA homologues and not considered for further analysis. For each mobile DfrA homologue in the panel, the first, if any, TBLASTN hit satisfying these thresholds was considered, for the purposes of this study, to be a proxy for the closest putative chromosomally encoded FolA protein. The choice of representative DfrA sequences did not alter the TBLASTN results. To complete the panel of protein sequences used to reconstruct the evolutionary history of DfrA/FolA sequences, we used the non-redundant panel of mobile DfrA sequences to identify via BLASTP (E value $<1e^{-20}$, coverage >75%) FolA proteins encoded by the chromosomes of NCBI RefSeq representative species for all bacterial orders, and for each bacterial family in the *Proteobacteria*. In addition, the closest archaeal homologues of bacterial FolA sequences were determined by searching with BLASTP the NCBI protein database, restricted to *Archaea* (taxid:2157), with the *Escherichia coli* FolA protein. A member of each family from the order (*Halobacteriales*) of the identified best archaeal hit of *E. coli* FolA was sampled to populate the outgroup.

Phylogenetic analysis

For phylogenetic inference, we performed a T-COFFEE multiple sequence alignment of protein sequences for the complete panel of DfrA and FolA homologues, combining three CLUSTALW (version 2.1) profile amino acid sequence alignments with different (5, 10, 25) gap opening penalties and leveraging the *E. coli* FolA crystal structure (P0ABQ5) to adjust gap penalties [35]. The resulting amino acid sequence alignment was processed with Gblocks version 0.91b (allowed gap positions, with half; minimum number of sequences for a conserved position, 86; minimum number of sequences for a flanking position, 95; maximum number of contiguous nonconserved positions, 5; minimum length of a block, 4) [36]. Bayesian phylogenetic inference on the trimmed multiple amino acid sequence alignment was carried out with MrBayes version 3.2.6 [37]. Four Metropolis-coupled Markov

chain Monte Carlo simulations with four independent chains were run for 20000000 generations, using a mixed four-category gamma distributed rate plus proportion of invariable sites model [invgamma] and a JTT (Jones–Taylor–Thornton) amino acid substitution model [38]. Chains were sampled every 100 iterations and stationarity was analysed with Tracer version 1.7.1 [39] by monitoring the estimated sample size (ESS). To determine burn-in, chain results were summarized with MrBayes imposing the restriction that ESS be above 200 and that the potential scale reduction factor be within 0.005 of 1. Based on summarization results, the burn-in was set at 20% of iterations. A consensus tree was generated with the half-compat option and visualized using the GGTREE version 1.14.6 R library [40]. Clades of reported DfrA proteins were determined as branches with posterior probability values higher than 0.8 containing at least five reported DfrA sequences. Ancestral state reconstruction of a single binary trait (mobile/chromosomal) was performed with BayesTraits version 3.0.2 [41]. The mobile/chromosomal state of each sequence was determined through the data collection pipeline outlined above. Known states at tree tips were labelled, and ancestral states were reconstructed using the multistate and maximum-likelihood settings.

DNA techniques and *in vitro* trimethoprim-susceptibility assay

With the exception of the *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (Marc Valls, Center for Research in Agricultural Genomics, Barcelona, Spain) and *E. coli* K-12 (CGSC5073) *folA* genes, which were amplified from genomic DNA, *dfrA* and *folA* homologues were adapted to *E. coli* codon usage, synthesized (ATG:biosynthetics) and then subcloned into a dephosphorylated pUA1108 vector [42] using an *NdeI* and *BamHI* (New England Biolabs) double digest when possible. Genes with internal restriction sites for any of these two enzymes were subcloned into the same vector using the HiFi DNA assembly kit (New England Biolabs), following the manufacturer's protocol. Oligonucleotides used in this work are listed in Table S4. All constructs were validated by sequencing (Macrogen) prior to their use in transforming *E. coli* K-12 (CGSC5073). The minimum inhibitory concentration (MIC) for trimethoprim (Sigma-Aldrich) for strains of *E. coli* K-12 (CGSC5073) carrying different versions of pUA1108 encoding *folA* or *dfrA* homologues was determined following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines using microdilution tests in Mueller–Hinton (MH) broth (Merck) [43]. All MIC assays were performed in triplicate. Colonies were grown on Luria–Bertani agar for 18 h and then suspended in sterile 0.9% NaCl solution to a McFarland 0.5 turbidity level. Suspensions were then diluted at 10^{-3} in MH broth, and $50\ \mu\text{l}$ (5×10^8) cells were inoculated into microtitre plates that contained $50\ \mu\text{l}$ MH broth supplemented with 1024–0.250 mg trimethoprim l^{-1} . To determine growth, optical density at 550 nm was measured after 24 h incubation at 37°C. The *dfrA1* gene was used as a positive control [44] and the *E. coli folA* gene as a negative control [45].

Sequence analysis

To assess whether the identified chromosomal gene associated with a mobile *dfrA* gene is the canonical *folA* gene for the genus, and not the product of a subsequent recombination of the mobile *dfrA* gene into the chromosome, we computed the pairwise amino acid identity among the products of all chromosomal *folA* homologues and then compared this distribution with the pairwise amino acid identity of the putative origin versus the chromosomal *folA* homologues. We used a one-sided Mann–Whitney U test to determine whether the two distributions were significantly different. To analyse the mol% G+C content relationship between *sulI/dfrA* genes and their host chromosomes, we used pre-compiled panels of sequences for non-redundant Sul [25] and DfrA homologues to search protein records associated with NCBI GenBank/RefSeq sequences of mobile genetic elements. The nucleotide sequences of the genes encoding these proteins was then retrieved. The mol% G+C content of the corresponding *sulI* and *dfrA* genes, as well as the overall mol% G+C content in both the mobile genetic element and the chromosome of the species harbouring it, were computed with custom Python scripts. To analyse whether mobile *dfrA* genes with mol% G+C content close to their hosts' genomes are more similar to the hosts' *folA* genes than expected if *dfrA*–host associations were arbitrary, we performed a permutation test comparing the mean pairwise amino acid sequence alignment distance between DfrA proteins and host-encoded Fola proteins. We randomly permuted DfrA–host assignments 1000 times and computed the corresponding *P* value as the rank of the non-permuted mean pairwise alignment distance. The input files and scripts used for data collection and analysis are available in public repositories: (i) input files (JSON, TXT and FASTA) and BLAST database for Python scripts used in data collection and analysis – <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12156891.v1>, and (ii) GitHub repository containing the Python scripts used for data collection and analysis – <https://doi.org/10.5281/zenodo.3760352>.

RESULTS AND DISCUSSION

A large fraction of reported *dfrA* genes share a common evolutionary origin

To explore the phylogenetic relationship of trimethoprim-resistance determinants with their chromosomally encoded *folA* counterparts, we used a non-redundant panel of protein sequences encoded by reported *dfr* genes (Table S2) to detect putative DHFR homologues in sequenced mobile elements. We discarded sequences associated with the *dfrB* gene family, and retained for analysis non-redundant sequences mapping to the clades defined by *dfrA* genes reported in the *Proteobacteria* and by *dfrDEFGK* genes associated with Gram-positive bacteria. For convenience, and in accordance with recent reports on *dfr* nomenclature [46], we hereinafter designate these two groups (*dfrA* and *dfrDEFGK*) with the umbrella term *dfrA*. These reference mobile DfrA homologues were then combined with Fola homologues sampled from representative genomes of all bacterial orders with complete

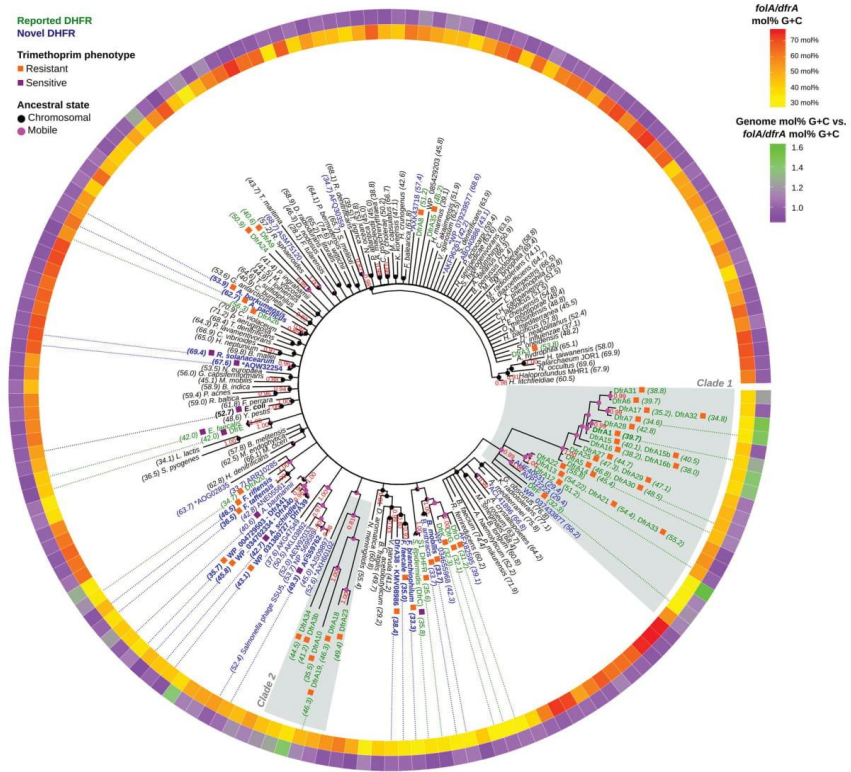


Fig. 1. Consensus tree of DHFR protein sequences. Branch support values are provided as Bayesian posterior probabilities estimated after four independent runs of 20000000 generations. Support values are only shown for branches with posterior probability values higher than 0.8. For chromosomal DHFR, the species name is displayed. Mobile DHFRs are denoted by their established *dfrA* name or by their NCBI GenBank accession number. Reported *dfrA* genes deemed redundant (>90% identity) are listed next to the corresponding non-redundant taxon included in the analysis. Next to each tip label, coloured boxes designate trimethoprim-resistant (orange) and -sensitive (purple) DHFR. Numbers between brackets indicate the mol% G+C content of the sequence for the gene encoding the DHFR. Tip label colouring denotes previously reported (green) and novel (blue) DHFRs. Bold label text indicates that resistance has been experimentally assessed in this work. DHFR variants marked with an asterisk are encoded in megaplasmids (>400 kbp). The internal ring shows the mol% G+C of the gene encoding the DHFR in a yellow-red colour scale, while the external ring displays the ratio between the mol% G+C content of the genome harbouring the DHFR gene and the mol% G+C content of the gene. Dotted lines from the inner ring to tip labels denote genes discussed in the text. Reconstructed mobile/chromosomal states are displayed on ancestral nodes as pink/black pie charts.

genome assemblies, and of each bacterial family within the *Proteobacteria* (Table S5). The resulting multiple amino acid sequence alignment was used to perform Bayesian phylogenetic analysis of FolA/DfrA sequences.

The phylogenetic tree shown in Fig. 1 showcases the genetic diversity of DfrA/FolA proteins, which encompass sequences with pairwise amino acid sequence identities ranging from 99 to 20% (Table S6). The resulting phylogeny also reveals that the vast majority (70.7%) of known DfrA sequences map

to two well-supported (>0.8 posterior probability), distinct clades that likely arose from two different ancestors. The first clade (clade 1), typified by the DfrA1 and DfrA12 proteins [47], includes 22 sequences encoded by previously reported *dfrA* genes with a mean amino acid identity of 51.19% ± 17.63 SD, divided into two subgroups (containing 17 and 5 known *dfrA* genes, respectively) and associated with *Gammaproteobacteria* pathogens. This clade also includes a basal set of taxa composed of the *Clostridioides difficile* *dfrF* gene and

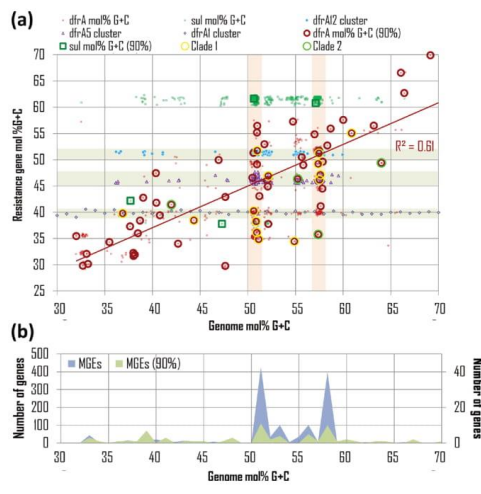


Fig. 2. Correlation between the mol% G+C content of mobile *dfrA* (red circles) and *sul* (green squares) genes and that of their host genome. Large open circles/squares denote representatives of clusters of redundant sequences (identity >90%), and *dfrA* genes from clade 1 and clade 2 in Fig. 1 are marked with an additional corona. A 0.75% jitter to both x- and y-axis values has been applied for visualization purposes. The red line shows the linear regression for representative *dfrA* gene values. The Pearson R^2 coefficient is superimposed. Vertical background bars in (a) designate *DfrA* sequences harboured by mobile genetic elements (MGEs) identified in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates, which are heavily overrepresented in the dataset. Sequences from clusters with more than 100 sequences (represented by *dfrA12*, *dfrA5* and *dfrA1*) are shown with specific markers, and highlighted by horizontal background bars. The number of MGEs identified as harbouring *dfrA* genes, before and after filtering *dfrA* sequence identity (>90%), is shown in (b).

two newly identified mobile *dfrA* homologues also from *Firmicutes* isolates. The second clade (clade 2), exemplified by *DfrA18* [48], comprises a group of six highly diverged ($34.37\% \pm 10.15$ sd mean amino acid identity) *DfrA* sequences from *Gammaproteobacteria* isolates.

Analysis of the *dfrA* gene sequences in these two clades reveals an unexpected degree of heterogeneity in mol% G+C content. In the first clade, several *dfrA* homologues, including the *C. difficile dfrF* gene, show relatively low mol% G+C content (Fig. 1, inner ring), matching the *Firmicutes* species they were reported on (Table S7, Fig. 1, outer ring). Similarly, *dfrA* genes in the *dfrA12* group show a mol% G+C content (53.28 mol% ± 1.80 sd) that is well in line with that of the *Enterobacteriaceae* isolates harbouring them. Conversely, the largest group in this clade, encompassing *dfrA1*, *dfrA7* and *dfrA14*, shows a mean mol% G+C content of 41.03 mol% ± 3.99 sd, which is substantially lower than the average mol% G+C content of the *Enterobacteriaceae* harbouring these mobile elements. The same holds true for the second clade (*dfrA18*),

which also shows lower mol% G+C content (43.88 mol% ± 4.91 sd) than expected for the *Enterobacteriaceae*. To ascertain whether this pattern of mol% G+C heterogeneity extended to other previously reported and putative *dfrA* genes, we examined the mol% G+C content of *dfrA* (935 genes) and *sul* (408 genes) homologues identified in this analysis with respect to the genome mol% G+C content of the host species harbouring these mobile resistance genes.

The results shown in Fig. 2(a) and Table S8 reveal that *dfrA* genes tend to align with host genome mol% G+C content (Pearson $\rho=0.56$), whereas *sul* genes display a two-tiered distribution of mol% G+C content that is essentially independent of host genome mol% G+C (Pearson $\rho=0.14$). Available *dfrA* and *sul* sequences are dominated by variants of a known *dfrA* and *sul* genes that have been isolated predominantly in a select group of bacterial hosts (Fig. 2b). To correct for this skew, we filtered *dfrA* sequences based on the amino acid identity (<90%) of their encoded proteins. This filtering resulted in a significantly smaller number of non-redundant representative *dfrA* (63 genes) and *sul* (4 genes) sequences (Table S9). The four representative *sul* genes correspond to one exemplar of the *sul1* and *sul2* families, and two exemplars of the *sul3* family. Among representative *dfrA* genes, 14 map to the first clade (clade 1) of Fig. 1 and 4 to the second clade (clade 2). The correlation of *dfrA* genes with host genome mol% G+C increases significantly (Pearson $\rho=0.78$) when considering only non-redundant representative *dfrA* sequences. The fact that the mol% G+C content of representative *dfrA* sequences aligns well with their host genome mol% G+C could suggest that mol% G+C content in *dfrA* genes has been ameliorated to match the host's. Alternatively, it could indicate that the mobile *dfrA* gene originated via mobilization of a chromosomal *folA* gene from a bacterium in the same clade as the current host. The later scenario posits that, besides mol% G+C content similarity, representative *dfrA* genes should also encode proteins with significant sequence similarity to their hosts' *FolA* protein. We performed a permutation test to analyse whether representative *dfrA* gene products show significant similarity with their hosts' *FolA* protein (Table S10). Our results indicate that this is the case ($P<0.001$), suggesting that most mobile *dfrA* genes are still associated with species from the same clade they originated in.

The filtering of *dfrA* sequences based on amino acid identity brings forward three large clusters (represented by *dfrA12*, *dfrA5* and *dfrA1*, and belonging to clade 1 from Fig. 1) containing more than 100 genes with amino acid identity larger than 90%. The *dfrA* genes in these clusters show a distribution of mol% G+C content that is essentially independent of the host genome mol% G+C, as in the case of *sul* genes (Fig. 2a), and their products show no significant sequence similarity with the hosts' *FolA* (permutation test $P>0.1$). This indicates that the *dfrA* genes in these large clusters have spread across distantly related bacterial clades, primarily through their association with *sul*-containing integron-based transposable elements that are widely disseminated among clinically relevant bacteria [49, 50]. This analysis also brings to the fore the presence of multiple *dfrA* cluster representatives,

with widely divergent mol% G+C, on narrow bands of host genome mol% G+C content. These bands correspond to *E. coli* (50.7 mol% G+C) and *Klebsiella pneumoniae* (57.4 mol% G+C) isolates, which are heavily oversampled in the dataset (Fig. 2b). The marked divergence in mol% G+C content (*E. coli*, 9.55 mol% \pm 6.15 SD; *K. pneumoniae*, 6.93 mol% \pm 4.63 SD) and amino acid sequence identity (*E. coli*, 38.57% \pm 15.24 SD; *K. pneumoniae*, 38.39% \pm 14.02 SD; Table S11, Fig. S2) among these representative *dfrA* genes suggests that they originated via mobilization from a diverse set of chromosomal backgrounds.

The fact that the mol% G+C of *dfrA* genes aligns with their host genome's mol% G+C, and that DfrA proteins display higher amino acid sequence identity when aligned to their host genome Foa proteins than to other Foa proteins, strongly supports the notion that *dfrA* genes have been mobilized multiple times within different bacterial clades [13]. In a few instances, typified by the large *dfrA* clusters illustrated in Fig. 2, *dfrA* genes have been captured by highly efficient mobile elements and dispersed widely across unrelated groups of bacteria [49]. These mobile elements often harbour *sul* genes, which also display a host-independent mol% G+C distribution. Many of the *dfrA* genes identified here are associated with clinical isolates. The divergent mol% G+C content and amino acid identity of these *dfrA* genes indicates that pathogenic bacteria have obtained *dfrA* genes on multiple occasions and from different sources, highlighting the ability of mobilized resistance determinants to reach clinically relevant pathogens [17, 51].

Novel trimethoprim-resistance determinants of *Acinetobacter* clinical isolates identified through phylogenetic methods

The phylogenetic tree in Fig. 1 includes reported DfrA proteins and their putative homologues, as well as Foa proteins identified via TBLASTN as putative DfrA homologues or sampled uniformly across bacterial clades. The inferred phylogeny also reveals several groups of previously unreported mobile DHFR homologues that form well-supported clades in association with chromosomal Foa proteins. Hence, these Foa proteins could constitute the chromosomal origins of the associated mobile DHFR homologues, and provide insights into the emergence and dissemination of trimethoprim-resistance genes. To determine whether these mobile DHFR homologues did confer resistance to trimethoprim, we cloned a subset of *dfrA/foa* genes and performed broth microdilution assays to determine the MIC of trimethoprim. Considering that the clinical breakpoint for trimethoprim in *E. coli* is 4 mg l⁻¹ [52], the results, shown in Table 1, reveal that most of the mobile DHFR homologues identified here do confer significant resistance to trimethoprim. The sole exception is the protein AQW32254. Close inspection revealed that this DHFR homologue is encoded by a megaplasmid (1.2 Mb) from a *Ralstonia* isolate, and that this is the only DHFR homologue present in its complete genome. Hence, we determined that this DHFR

homologue was a bona fide Foa protein and not a mobile DHFR homologue, and we excluded from further analysis all other DHFR homologues identified in megaplasmids (>400 kbp).

Two remaining clades of novel mobile DHFR homologues from clinically relevant bacteria associated with chromosomal Foa proteins were shown to confer resistance to trimethoprim on *E. coli* (Table 1). To investigate whether the sequence determinants conferring resistance had originated in the associated chromosomal background, we cloned the most closely related chromosomal *foa* gene as well as a gene encoding an additional DHFR homologue from the same genus, and performed broth microdilution assays to determine the MIC of trimethoprim. We also performed ancestral state reconstruction of the molecule encoding the DHFR homologues (chromosomal/mobile trait), as determined during the data collection process (Tables S5 and S12).

The combined results of Table 1 and Fig. 1 reveal different patterns of trimethoprim-resistance acquisition. The protein KMV08986 is a DHFR homologue harboured by a conjugative plasmid from an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. Its most closely related chromosomally encoded DHFR homologue is the Foa protein of *Flavobacterium branchiophilum*, which confers resistance to trimethoprim (Table 1). To ascertain whether this chromosomally encoded DHFR homologue was encoded by a bona fide *foa* gene, instead of a mobile *dfrA* gene that integrated into the chromosome, we compared the genus-wide distribution of pairwise amino acid sequence alignment distances between Foa proteins to the pairwise distance of the identified homologue versus all other Foa proteins in the genus. The *Flavobacterium branchiophilum* Foa sequence is significantly different from other *Flavobacterium* Foa sequences (Mann-Whitney U $P < 0.05$; Table S13), raising the possibility that this chromosomal gene could be in fact a recombinant mobile *dfrA* gene. However, phylogenetic analysis with a broader representation of *Flavobacterium* sequences (Fig. S3) confirms the well-supported branching of *Flavobacterium branchiophilum* Foa with other *Flavobacterium* species Foa proteins, and comparative genomics analysis reveals that the genetic neighbourhood of the chromosomal *foa* gene is conserved in the genus *Flavobacterium* (Fig. S4). Furthermore, the Foa protein of a prototypical genus member, *Flavobacterium faecale*, also confers resistance to trimethoprim on *E. coli* (Table 1). These results indicate that the Foa protein was likely resistant to trimethoprim in the ancestor of extant *Flavobacterium* species, which diverged more than 50 million years ago [53]. The branching of the *Acinetobacter baumannii* protein KMV08986 in the reconstructed phylogeny and the associated ancestral state reconstruction indicates that this mobile DHFR homologue likely originated via mobilization of a chromosomal *foa* gene within the phylum *Bacteroidetes*. The encoded Foa protein was likely resistant to trimethoprim, but the exact donor species remains to be elucidated.

Table 1. MICs of trimethoprim for wild-type *E. coli* K-12 (CGSC5073) and derivatives carrying different versions of *dfr/foIA* or the control empty vector. Values are representative of four independent replicates.

Strain	Mobile / chromosomal	Nucleotide accession no.	Cloned protein ID	Trimethoprim (mg l ⁻¹)
<i>E. coli</i> CGSC5073	–	–	–	0.25
<i>E. coli</i> pUA1108	–	–	–	0.25
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>E. coli</i>	C	NC_000913	WP_000624375	4
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>dfrA1</i>	M	NC_002525	WP_000777554	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Flavobacterium branchiophilum</i>	C	NC_016001	WP_014083133	256
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Flavobacterium faecale</i>	C	NZ_CP020918	WP_108740183	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>dfrA38</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	M	CP021344	KMV08986	256
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Acinetobacter schindleri</i>	C	NZ_CP025618	WP_004813248	0.25
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>dfrA39</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	M	NZ_CP021785	WP_031380727	512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>dfrA40</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	M	NZ_JEVW01000010	WP_034702334	128
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>dfrA41</i> <i>Acinetobacter defluvii</i>	M	NZ_CP029396	WP_004729503	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Fluviicola taffensis</i>	C	NC_015321	WP_013685591	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> 'Candidatus <i>Fluviicola riflensis</i> '	C	CP022585	ASS49886	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Alcanivorax pacificus</i>	C	NZ_CP004387	WP_008736147	32
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Alcanivorax borkumensis</i>	C	AM286690	CAL17791	16
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Bacillus mobilis</i>	C	NZ_CP031443	WP_000637217	>512
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>Ralstonia solanacearum</i>	C	NC_003295	WP_011000898	0.5
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> blood disease bacterium A2-HR MARDI	M	CP019912	AQW32254	1
<i>E. coli</i> pUA1108:: <i>foIA</i> <i>E. coli</i> O104:H4	M	CP003298	AFS59762	2

In contrast to *Flavobacterium* proteins, the *Acinetobacter schindleri* *foIA* protein does not confer resistance to trimethoprim, in agreement with previous reports of *Acinetobacter schindleri* susceptibility to trimethoprim [54], and with the well-established susceptibility of *Acinetobacter baumannii* *foIA* to trimethoprim [55, 56]. The *Acinetobacter schindleri* *foIA* protein is closely related to three mobile DHFR homologues conferring resistance to trimethoprim and harboured by *Acinetobacter baumannii* (protein ID: WP_031380727, WP_034702334) and *Acinetobacter defluvii* (protein ID: WP_004729503) clinical and environmental isolates. These mobile DHFR homologues branch within a well-supported clade of chromosomal *Acinetobacter* *foIA* proteins, as supported by ancestral state reconstruction (Fig. 1, Table S12). The trimethoprim susceptibility of *Acinetobacter* chromosomal *foIA* genes and the phylogenetic placement of these DHFR homologues, hence, indicates that the observed resistance to trimethoprim was acquired immediately prior to or after mobilization from an *Acinetobacter* chromosomal background. This is supported by the observation that these mobile DHFR homologues confer different levels of resistance to trimethoprim (Table 1), and that the largest MIC correlates with the location of the DHFR homologue on a plasmid harbouring

multiple antibiotic-resistance determinants (Fig. S5). The gene encoding this DHFR homologue is preceded by an insertion sequence transposase (Fig. S5), in an arrangement that has been reported to drive up expression of the DHFR homologue through promoter enhancement [57]. However, the MIC determined here corresponds to that of the isolated DHFR ORF, indicating that it confers heightened resistance irrespective of the promoter driving its expression. This suggests that these DHFR homologues have acquired mutations conferring heightened resistance to trimethoprim in parallel to their broader dissemination on multi-resistant mobile elements. Based on their validated trimethoprim-resistance phenotype and their level of amino acid sequence identity versus previously reported DfrA proteins (<95%; Table S14) [13], we propose to designate these *Acinetobacter* DHFR homologues as DfrA38 (protein ID: KMV08986), DfrA39 (protein ID: WP_031380727), DfrA40 (protein ID: WP_034702334) and DfrA41 (protein ID: WP_004729503).

Here, we report the identification of trimethoprim-susceptible chromosomal *foIA* genes that are closely related to mobile *dfrA* genes, as well as the discovery of chromosomally encoded *foIA* genes conferring resistance to trimethoprim. This indicates that, in contrast to sulfonamides [25],

trimethoprim-resistance mutations with small or negligible fitness cost must occur frequently enough in natural environments. These *folA* variants can then be selected for and mobilized upon exposure to trimethoprim. It is well-documented that resistance to trimethoprim, mediated by mutations in the chromosomal *folA* gene, develops very rapidly and in a fairly structured way [58–60], whereas resistance to sulfonamides takes much longer to evolve in a laboratory setting. Moreover, sulfonamide-resistant mutants typically show significantly reduced affinity to PABA. This results in a net fitness cost in the absence of sulfonamide that is only palliated by the emergence of subsequent compensatory mutations [61, 62]. Beyond structural constraints on the respective binding pockets, a crucial difference between both chemotherapeutic agents lies in their respective targets. While trimethoprim directly inhibits DHFR, sulfonamides compete with PABA for access to DHPS, yielding a non-productive sulfonamide-bound di-hydropterin. For sulfonamides, therefore, it is the PABA-to-sulfonamide ratio that limits the production of di-hydropteroate from a limited pool of pteridine di-phosphate, and this cannot be altered via overexpression of DHPS [63]. Conversely, DHFR overexpression can provide partial resistance to trimethoprim, and mutations enhancing DHFR expression have been reported to be the first to appear in directed evolution experiments [60]. The ability to obtain partial resistance through overexpression may provide a stepping stone for the gradual accumulation and refinement of mutations conferring substantial resistance with little fitness cost and, hence, facilitate the development of trimethoprim resistance [59, 60].

Trimethoprim resistance in chromosomally encoded *folA* genes

Besides uncovering novel *dfrA* genes, the phylogenetic analysis in Fig. 1 also identifies several chromosomal *folA* genes associated with previously reported *dfrA* genes. Two of these chromosomal *folA* genes have already been reported in the literature as putative origins of *dfrA* genes, and their identification here provides some degree of validation for the phylogenetic approach implemented in this work. The putative chromosomal origin for *Staphylococcus aureus* Tn4003 S1-DHFR has been identified as the chromosomally encoded *dfrC* gene (*Staphylococcus epidermidis*) and is reported to be susceptible to trimethoprim [64]. The *Enterococcus faecalis* *dfrE* gene, identical to the chromosomally encoded *folA* gene of *Enterococcus faecalis*, was reported to confer moderate resistance to trimethoprim in *E. coli*, but only when cloned in a multicopy plasmid, which could easily result in overexpression-mediated resistance [63, 65].

To ascertain whether the chromosomal *folA* genes found here to be associated with other known *dfrA* genes (*dfrA20*, *dfrA26* and the *dfrDGK* cluster) confer resistance to trimethoprim, we performed broth microdilution assays to determine the MIC of trimethoprim on these chromosomally encoded F_{olA} proteins and on another F_{olA} protein from the same genus. In all cases, both related

F_{olA} proteins confer resistance to trimethoprim (Table 1). The most closely associated chromosomal *folA* genes are not significantly different from other *folA* genes in their respective genera (Mann–Whitney U $P > 0.05$; Table S13), as reflected also by substantial conservation of the *folA* genomic neighbourhood (Fig. S4). Together, these data indicate that resistance to trimethoprim was present in the ancestor of these genera. The *dfrA26* gene was identified in a *K. pneumoniae* clinical isolate and its most closely associated chromosomal *folA* gene is a member of the genus *Alcanivorax*. The branching pattern of *dfrA26* within this clade and ancestral state reconstruction results (Fig. 1, Table S12) suggest that it arose via mobilization of a chromosomal *folA* gene from the genus *Alcalinivorax*. The *dfrDGK* genes have been reported in *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus*, and ancestral state reconstruction results indicate that these mobile *dfrA* genes originated through mobilization of a member of closely related genus *Bacillus*, members of which have been reported to be naturally resistant to trimethoprim [66]. In both cases, therefore, the phylogenetic evidence and the similarity in mol% G+C content among chromosomal and mobile genes (Fig. 1, Table S15) point towards a mobilization event that has to date remained circumscribed to related genera. Conversely, the *dfrA20* gene was identified in a *Pasteurella multocida* isolate, yet the chromosomal *folA* gene most closely associated to it is encoded by *Fluviicola taffensis*, a *Bacteroidetes*; hence, suggesting a much more distant mobilization event (Fig. 1, Table S15). In all three cases, however, we find evidence that pre-existing resistant *folA* genes can be readily mobilized from both close (e.g. *dfrDGK*) or distant (e.g. *dfrA20*) species.

The resistance to trimethoprim reported here for the chromosomal *folA* genes of two different genera of *Bacteroidetes*, two distinct *Alcanivorax* species and a *Bacillus* strain underscores the deep ancestry of chromosomal mutations yielding resistance to trimethoprim. The *folA* genes of *Flavobacterium* and *Fluviicola* were shown here to confer resistance to trimethoprim. These two genera are thought to have diverged more than 500 million years ago and define major lineages within the *Flavobacteriales*, suggesting that resistance to trimethoprim emerged in an ancestor of this bacterial order. It is worth noting that several of the chromosomal *folA* genes shown here to be associated with mobile DHFR homologues (*Alcanivorax*, *Flavobacterium* and *Fluviicola*) appear to be resistant at the genus level and correspond to genera of aquatic bacteria. This parallels our recent identification of soil and subterranean water bacteria as the likely originators of clinical sulfonamide-resistance genes [25], and suggests that the intensive use of trimethoprim/sulfamethoxazole in agriculture, aquaculture and animal husbandry in the last 50 years may have acted as a trigger for the selection and mobilization of pre-existing *folA* and *folP* genes conferring resistance to trimethoprim and sulfonamides. Conversely, trimethoprim-susceptible chromosomal *folA* genes found here to be associated with *dfrA* genes belong to clinically relevant genera

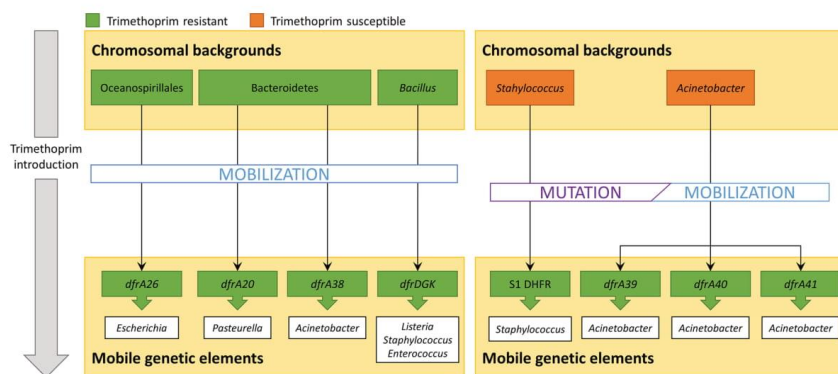


Fig. 3. Schematic representation of the two proposed evolutionary processes (based on the results presented in Figs 1 and 2, and Table 1) leading to the dissemination of trimethoprim-resistance determinants. Left panel: upon the introduction of trimethoprim, mobilization events involving pre-existing resistant chromosomal *folA* genes can be favourably selected. Right panel: following the introduction of trimethoprim, mobilization events involving *folA* genes with novel mutations that confer resistance to this chemotherapeutic agent may be selected for and disseminated among closely related bacteria.

(*Staphylococcus* and *Acinetobacter*) that may have been under more direct trimethoprim pressure. This suggests that among relatively isolated bacterial populations, frequent exposure to high levels of trimethoprim may trigger the mobilization of spontaneous *folA* mutants, whereas longer term exposure to sub-lethal doses of trimethoprim in ecological rich habitats might instead rely predominantly on the mobilization of naturally resistant *folA* genes (Fig. 3).

Phage-encoded *folA* genes do not confer resistance to trimethoprim

Our phylogenetic analysis also identifies a well-defined clade of *Enterobacteriaceae* cryptic plasmids derived from *Salmonella* phage SSU5 and encoding DHFR homologues [67–70]. Genes encoding DHFR homologues occur frequently in many bacteriophage families, often in tandem with thymidylate synthase genes [71], but their functional role has not been fully elucidated. We performed broth microdilution assays to determine the MIC of trimethoprim of *E. coli* O104:H4 DHFR (protein ID: AFS59762). This phage-encoded DHFR does not confer resistance to trimethoprim (Table 1). The high amino acid sequence identity and neighbourhood conservation among the DHFR enzymes encoded by these *Enterobacteriaceae* cryptic plasmids and phages (Table S16, Fig. S4) would presumably suggest that these DHFR enzymes are susceptible to trimethoprim.

Bacteriophages can transfer substantial amounts of genetic material via generalized transduction, and their potential as reservoirs of antibiotic-resistance determinants has gained increased attention with the advent

of metagenomics [72, 73]. However, recent studies have shown that many potential resistant determinants encoded by phages do not confer resistance against their putative targets. Furthermore, only a small proportion of complete phage genomes contain putative antibiotic-resistance genes [74]. Enzymes participating in the folate biosynthesis pathway, however, are relatively frequent in phage genomes. These include homologues of the *folP* gene encoding DHPS, of the *thyX* gene encoding flavin-dependent thymidylate synthase [75–77] and, predominantly, homologues of the *folA* gene encoding DHFR, often found in tandem with the *thyA* gene encoding type 1 thymidylate synthase [71].

Early work on *Enterobacteria* phage T4 showed that the phage-encoded *thyA* and *folA* gene products are functional and also participate in the phage baseplate structure [78], and *thyX* has been shown to be functional in a number of phages [75–77]. It has been proposed that these genes help bacteriophages overcome shortages in the deoxynucleotide pool during replication, but their potential in conferring resistance to sulfonamides or trimethoprim remains largely unexplored. The detection here of DHFR homologues in *Enterobacteriaceae* cryptic plasmids and phages, and the subsequent assessment of their trimethoprim susceptibility, reinforces the notion that these genes have been functionally co-opted by phages principally for deoxynucleotide synthesis. Nonetheless, these genes may still confer partial trimethoprim resistance as a by-product of *folA* overexpression, as recently reported for *Stenotrophomonas maltophilia* phage DLP4 [79].

Conclusions

Recent work has shown that resistance to sulfonamide, a synthetic chemotherapeutic agent, can be present in the bacterial pangenome well before the discovery of the agent. Here, we have used a combination of *in silico* and *in vitro* techniques to identify novel trimethoprim-resistance genes, and to identify chromosomal *folA* genes that are strongly associated with novel and previously reported *dfpA* genes. We find that most of the chromosomal *folA* genes associated with mobile *dfpA* genes confer resistance to trimethoprim, but we detect cases of novel mutations being rapidly mobilized. Hence, our work shows that the observations from sulfonamide resistance extend to trimethoprim, with generalized chromosomal resistance determinants predating the origin of several genera and several clusters of resistance genes disseminated broadly among clinical isolates. Moreover, this work also reveals that, unlike sulfonamides, resistance to trimethoprim is relatively easy to generate and frequently associated with species from the same clade it originated in. The identification of ancient resistance determinants for two synthetic chemotherapeutic agents strongly suggests that resistance to any novel drugs is likely to be already present in the bacterial pangenome. Systematic screening of existing natural variants could provide, therefore, the means to preemptively identify derivatives presenting widely distributed natural resistance determinants and, conversely, to engineer derivatives that circumvent most, if not all, natural resistant variants.

Funding information

This work was supported by grant BIO2016-77011-R from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad to J.B. M.S.-O. was the recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España.

Acknowledgements

The authors wish to thank Joan Ruiz and Susana Escribano for their technical support during some of the experimental procedures, as well as Ángela Martínez-Mateos for her continued support. The authors also express their gratitude to Dr Marc Valls for kindly providing the *R. solanacearum* GMI1000 strain.

Author contributions

Conceptualization, J. B., I. E.; data curation, M. S.-O., I. E.; formal analysis, M. S.-O., I. E.; funding acquisition, M. L., J. B.; investigation, M. S.-O., P. C., I. E.; methodology, M. L., J. B., I. E.; project administration, P. C., M. L., J. B., I. E.; resources, P. C., M. L., J. B.; software, M. S.-O., I. E.; supervision, P. C., J. B., I. E.; visualization, M. S.-O., I. E.; manuscript preparation – original draft, M. S.-O., I. E.; manuscript preparation – review and editing, M. S.-O., P. C., M. L., J. B., I. E.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 2019;47:W256–W259.
- Carlet J, Rambaud C, Pulcini C. Save antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). *BMC Infect Dis* 2014;14:436.
- Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 2014;18:56–60.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74:417–433.
- Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R et al. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 2016;353:1147–1151.
- Hegreness M, Shores N, Damian D, Hartl D, Kishony R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13977–13981.
- Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2007;271:147–161.
- Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol* 2013;4:47.
- Kneid JG, Youssef MM, Kanafani ZA, Kanj SS. Combination therapy for Gram-negative bacteria: what is the evidence? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:1355–1362.
- Williams KJ. The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine – the first magic bullet. *J R Soc Med* 2009;102:343–348.
- Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 2010;1:134.
- Masters PA, O'Bryan TA, Zurlo J, Miller DQ, Joshi N. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. *Arch Intern Med* 2003;163:402–410.
- Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 2001;32:261–273.
- Quinlivan EP, McPartlin J, Weir DG, Scott J. Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J* 2000;14:2519–2524.
- Hitchings GH. Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole-I. *J Infect Dis* 1973;128:S433–S436.
- Landy M, Larkum NW, Oswald EJ, Streightoff F. Increased synthesis of p-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1943;97:265–267.
- Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:279–289.
- Flensburg J, Sköld O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response to the use of trimethoprim. *Eur J Biochem* 1987;162:473–476.
- Shin HW, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC et al. Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in Gram-negative bacilli. *J Microbiol Biotechnol* 2015;25:137–142.
- Rådström P, Swedberg G, Sköld O. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1840–1848.
- Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1169–1172.
- Tagg KA, Watkins LF, Moore MD, Bennett C, Joung YJ et al. Novel trimethoprim resistance gene *dirA34* identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:38–41.
- White PA, Rawlinson WD. Current status of the *aadA* and *dfp* gene cassette families. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:495–496.
- Toulouse JL, Edens TJ, Alejaldre L, Manges AR, Pelletier JN. Integron-associated *DfpB4*, a previously uncharacterized member of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase B family, is a clinically identified emergent source of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e02665-16.
- Sánchez-Osuna M, Cortés P, Barbé J, Erill I. Origin of the mobile di-hydro-pterolate synthase gene determining sulfonamide resistance in clinical isolates. *Front Microbiol* 2018;9:3332.
- Eddy SR. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* 2011;7:e1002195.
- Taly JF, Magis C, Bussotti G, Chang JM, Di Tommaso P et al. Using the T-Coffee package to build multiple sequence alignments

- of protein, RNA, DNA sequences and 3D structures. *Nat Protoc* 2011;6:1669–1682.
28. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D733–D745.
 29. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2017;45:D37–D42.
 30. Holm L, Sander C. Removing near-neighbour redundancy from large protein sequence collections. *Bioinformatics* 1998;14:423–429.
 31. Altschul Set al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389–3402.
 32. Kaushik S, Mutt E, Chellappan A, Sankaran S, Srinivasan N et al. Improved detection of remote homologues using cascade PSI-BLAST: influence of neighbouring protein families on sequence coverage. *PLoS One*;8:e56449.
 33. Brum JR, Ignacio-Espinoza JC, Roux S, Doulier G, Acinas SG et al. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. *Science* 2015;348:1261498.
 34. Chen Q, Zobel J, Verspoor K. Benchmarks for measurement of duplicate detection methods in nucleotide databases. *Database* 2017;2017:baw164.
 35. Wallace IM, O'Sullivan O, Higgins DG, Notredame C. M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1692–1699.
 36. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 2000;17:540–552.
 37. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003;19:1572–1574.
 38. Erill I. Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic Acids Res* 2006;34:66–77.
 39. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 2018;67:901–904.
 40. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, LamTT-Y. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods Ecol Evol* 2017;8:28–36.
 41. Pagel M, Meade A, Barker D. Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Syst Biol* 2004;53:673–684.
 42. Mayola A, Irazoki O, Martínez IA, Petrov D, Menolascina F et al. RecA protein plays a role in the chemotactic response and chemoreceptor clustering of *Salmonella enterica*. *PLoS One* 2014;9:e105578.
 43. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard*, 6th edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
 44. Fling ME, Richards C. The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn7. *Nucleic Acids Res* 1983;11:5147–5158.
 45. Smith DR, Calvo JM. Nucleotide sequence of the *E. coli* gene coding for dihydrofolate reductase. *Nucleic Acids Res* 1980;8:2255–2274.
 46. Faltyn M, Alcock B, McArthur A. Evolution and nomenclature of the trimethoprim resistant dihydrofolate (dfr) reductases. *Preprints* 2019;2019050137.
 47. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2011;2:203.
 48. Villa L, Visca P, Tosini F, Pezzella C, Carattoli A. Composite integron array generated by insertion of an ORF341-type integron within a Tn21-like element. *Microb Drug Resist* 2002;8:1–8.
 49. Grape M, Farra A, Kronvall G, Sundström L. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:185–192.
 50. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:627–634.
 51. Volz C, Ramoni J, Beisken S, Galata V, Keller A et al. Clinical resistome screening of 1,110 *Escherichia coli* isolates efficiently recovers diagnostically relevant antibiotic resistance biomarkers and potential novel resistance mechanisms. *Front Microbiol* 2019;10:1671.
 52. MacGowan AP, Wise R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:17–28.
 53. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Hedges SB. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol Biol Evol* 2017;34:1812–1819.
 54. Sigala J-C, Suárez BP, Lara AR, Borgne SL, Bustos P et al. Genomic and physiological characterization of a laboratory-isolated *Acinetobacter schindleri* ACE strain that quickly and efficiently catabolizes acetate. *Microbiology* 2017;163:1052–1064.
 55. Falagas ME, Vardakas KZ, Rousos NS. Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: a review of current microbiological and clinical evidence. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:231–241.
 56. Pérez-Varela M, Corral J, Aranda J, Barbé J. Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63:e02190-18.
 57. Leelaporn A, Firth N, Byrne ME, Roper E, Skurray RA. Possible role of insertion sequence IS257 in dissemination and expression of high- and low-level trimethoprim resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2238–2244.
 58. Vickers AA, Potter NJ, Fishwick CWG, Chopra I, O'Neill AJ. Analysis of mutational resistance to trimethoprim in *Staphylococcus aureus* by genetic and structural modelling techniques. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1112–1117.
 59. Watson M, Liu J-W, Ollis D. Directed evolution of trimethoprim resistance in *Escherichia coli*. *FEBS J* 2007;274:2661–2671.
 60. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl DL et al. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 2012;44:101–105.
 61. Swedberg G, Fermér C, Sköld O. Point mutations in the dihydropteroate synthase gene causing sulfonamide resistance. In: Ayling JE, Nair MG, Baugh CM (eds). *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. Boston, MA: Springer; 1993. pp. 555–558.
 62. Griffith EC, Wallace MJ, Wu Y, Kumar G, Gajewski S et al. The structural and functional basis for recurring sulfa drug resistance mutations in *Staphylococcus aureus* dihydropteroate synthase. *Front Microbiol* 2018;9:1369.
 63. Palmer AC, Kishony R. Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms. *Nat Commun* 2014;5:4296.
 64. Dale GE, Broger C, Hartman PG, Langen H, Page MG et al. Characterization of the gene for the chromosomal dihydrofolate reductase (DHFR) of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990: the origin of the trimethoprim-resistant S1 DHFR from *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 1995;177:2965–2970.
 65. Coque TM, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of dihydrofolate reductase genes from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:141–147.
 66. Barrow EW, Bourne PC, Barrow WW. Functional cloning of *Bacillus anthracis* dihydrofolate reductase and confirmation of natural resistance to trimethoprim. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4643–4649.
 67. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 2001;413:848–852.
 68. Ahmed SA, Awosika J, Baldwin C, Bishop-Lilly KA, Biswas B et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104:H4 isolates

- from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage stx2. *PLoS One* 2012;7:e48228.
69. Kim M, Kim S, Ryu S. Complete genome sequence of bacteriophage SSU5 specific for *Salmonella enterica* serovar typhimurium rough strains. *J Virol* 2012;86:10894.
 70. Octavia S, Sara J, Lan R. Characterization of a large novel phage-like plasmid in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 2015;362:fnv044.
 71. Asare PT, Jeong T-Y, Ryu S, Klumpp J, Loessner MJ et al. Putative type 1 thymidylate synthase and dihydrofolate reductase as signature genes of a novel bastille-like group of phages in the subfamily Spounavirinae. *BMC Genomics* 2015;16:582.
 72. Muniesa M, Colomer-Lluch M, Jofre J. Could bacteriophages transfer antibiotic resistance genes from environmental bacteria to human-body associated bacterial populations? *Mob Genet Elements* 2013;3:e25847.
 73. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog*;10:e1004219.
 74. Enault F, Briet A, Bouteille L, Roux S, Sullivan MB et al. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* 2017;11:237–247.
 75. Bhattacharya B, Giri N, Mitra M, Gupta SKD. Cloning, characterization and expression analysis of nucleotide metabolism-related genes of mycobacteriophage L5. *FEMS Microbiol Lett* 2008;280:64–72.
 76. Wittmann J, Gartemann K-H, Eichenlaub R, Dreiseikelmann B. Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. *Bacteriophage* 2011;1:6–14.
 77. Huang S, Zhang S, Jiao N, Chen F. Comparative genomic and phylogenomic analyses reveal a conserved core genome shared by estuarine and oceanic Cyanopodoviruses. *PLoS One* 2015;10:e0142962.
 78. Kozloff LM, Lute M, Crosby LK. Bacteriophage T4 virion base-plate thymidylate synthetase and dihydrofolate reductase. *J Virol* 1977;23:637–644.
 79. Peters DL, McCutcheon JG, Stothard P, Dennis JJ. Novel *Stenotrophomonas maltophilia* temperate phage DLP4 is capable of lysogenic conversion. *BMC Genomics* 2019;20:300.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

El uso de los compuestos antibacterianos desde su descubrimiento el pasado siglo, conjuntamente con el importante aumento en el conocimiento sobre las bacterias patógenas, han acrecentado enormemente la esperanza de vida humana (Aminov, 2010). En los últimos años, sin embargo, las infecciones causadas por bacterias patógenas se están convirtiendo en un serio problema de salud a nivel mundial. Alarmanamente, una gran parte de los aislados clínicos son resistentes a prácticamente todos los antibacterianos. Por ello, la emergencia de cepas multirresistentes provoca que, a pesar del amplio arsenal de antibacterianos disponible, algunas infecciones sean prácticamente intratables (Khan et al., 2018).

Las bacterias se caracterizan por su gran capacidad para desarrollar y para adquirir nuevas estrategias de resistencia frente a un amplio número de compuestos antibacterianos. Las células bacterianas presentan mecanismos muy diversos para hacer frente a la exposición de compuestos antibióticos o quimioterapéuticos que pueden ser adquiridos mediante mutaciones, o más frecuentemente, mediante transferencia lateral de elementos genéticos móviles. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, la modificación química del antimicrobiano, la disminución de su disponibilidad intracelular o el uso de vías y enzimas alternativas (Davies and Davies, 2010).

Como ya se ha indicado en los apartados anteriores, los diferentes genes que generan auto-resistencia en las bacterias productoras de antibióticos, han sido relacionados reiteradamente como el origen de los genes que confieren resistencia a los antibióticos en las bacterias patógenas de la actualidad (Aminov and Mackie, 2007). No obstante, los orígenes de los genes de resistencia contra los agentes quimioterapéuticos sintéticos son más difíciles de explicar puesto que han sido diseñados *in vitro* y no se producen de forma natural.

Por este motivo, la presente Tesis Doctoral tiene el objetivo de elucidar el origen de los genes que confieren resistencia clínica a las sulfamidas y al trimetoprim, que constituyen dos de los agentes quimioterapéuticos antibacterianos más utilizados en clínica desde mediados del siglo pasado.

4.1 Identificación y caracterización de nuevos genes codificados en elementos genéticos móviles que confieren resistencia a sulfamidas y trimetoprim

Las sulfamidas son agentes antibacterianos sintéticos usados desde los años treinta (Domagk, 1935). A partir de los años cuarenta se empezaron a aislar cepas mutantes resistentes a sulfamidas que contenían mutaciones en el gen *folP* cromosómico, que codifica la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS). Sin embargo, la resistencia clínica a las sulfamidas está principalmente mediada por elementos genéticos móviles que contienen los genes *sul*, que codifican versiones alternativas resistentes del enzima dihidropteroato sintasa (Sköld, 2000). Hasta la fecha se han identificado cuatro versiones diferentes de los genes *sul* (*sul1-4*), siendo *sul1* y *sul2* las que tienen más importancia clínica (Razavi et al., 2017; Sköld, 2000).

El trimetoprim, por otro lado, es también un agente antibacteriano sintético usado desde los años sesenta (Cooper and Wald, 1964). La resistencia cromosómica a trimetoprim, de forma similar a lo ya comentado para las sulfamidas, puede originarse mediante mutaciones en el gen *folA*, que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR), pero la resistencia clínica está asociada principalmente a las más de treinta versiones de los genes *dfr*, que codifican variantes alternativas resistentes del enzima dihidrofolato reductasa, esparcidos en elementos genéticos

móviles (Tagg et al., 2019). Los genes *dfr* están clasificados en dos familias (*dfrA* y *dfrB*) que codifican proteínas evolutivamente no relacionadas de tamaños marcadamente diferentes. Por similitud de secuencia, los genes *dfrA* están relacionados con los genes *folA* cromosómicos mientras que los genes *dfrB* son análogos funcionales de origen desconocido (Alonso and Gready, 2006). La nomenclatura de los genes *dfrA* varía en bacterias grampositivas ya que originalmente se consideró que no debían estar relacionados con los *dfrA*, codificados en bacterias gramnegativas, de manera que se nombraron siguiendo una convención alfabética (*dfrC-dfrK*).

Una de las principales ventajas del uso sistemático de métodos filogenéticos, partiendo de la totalidad de secuencias disponibles en las bases públicas de datos, es la capacidad que presentan estas metodologías para identificar nuevas variantes de genes *sul* y genes *dfrA* que, si bien no han sido reportados hasta el momento, pueden presentar relevancia clínica. En este contexto, a pesar de que no se detectaron nuevas variantes de los genes *sul*, se identificaron dos grupos nuevos de homólogos de DHFR que confieren resistencia al trimetoprim en aislados clínicos del patógeno nosocomial *A. baumannii*. En base a la capacidad de estos genes de generar resistencia *in vitro* a trimetoprim y el porcentaje de identidad respecto a los productos codificados por otros genes *dfrA* previamente reportados (la identidad entre dos DfrA diferentes debe ser <95% (Sköld, 2000)), estas variantes se designaron como DfrA38, DfrA39, DfrA40 y DfrA41.

A. baumannii es un microorganismo perteneciente al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), causante de infecciones en hospitales de todo el mundo, afectando normalmente a pacientes inmunodeprimidos ingresados en unidades de cuidados intensivos. El factor más preocupante de este microorganismo es su habilidad de desarrollar y adquirir resistencia contra múltiples antibacterianos, siendo intratable en muchas ocasiones (Peleg et al., 2012).

4.2 Evaluación de los procesos evolutivos que gobiernan la emergencia y diseminación de los genes que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim

4.2.1 Emergencia y mantenimiento de las mutaciones causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim

La presente Tesis Doctoral ilustra similitudes y diferencias significativas en los procesos que conducen a la aparición y diseminación de los genes móviles que confieren resistencia a trimetoprim y sulfamidas.

En primer lugar, los resultados relativos al estudio de los orígenes de los genes que confieren resistencia a las sulfamidas demuestran que los genes *sul1-3* identificados en cepas clínicas surgieron de dos eventos de movilización independientes de genes *folP* cromosómicos que se caracterizan por la presencia de un motivo de aminoácidos bien definido y exclusivo de los genes móviles (motivo Sul). La evidencia presentada en el presente trabajo sugiere un escenario evolutivo en el cual los genes móviles *sul1-3* que confieren resistencia clínica a sulfamidas derivan de mutaciones cromosómicas ancestrales en el gen *folP* que confieren resistencia a sulfamidas y que está codificado en las familias *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae*.

La aparición de mutaciones que generan resistencia a sulfamidas está ampliamente documentada (Huovinen et al., 1995; Sköld, 2000). Diversos estudios estructurales sugieren que la mayoría de mutaciones que confieren resistencia a sulfamidas modulan la accesibilidad de las sulfamidas al dominio de unión a PABA manteniendo inalterable la unión de éste (Baca et al., 2000; Morgan et al.,

2011). Adicionalmente, se ha documentado que la presencia de DHPS resistentes a sulfamidas no supone necesariamente un coste de *fitness* para la bacteria (Enne et al., 2004). Por lo tanto, es concebible que algunas de estas mutaciones que confieren resistencia a sulfamidas puedan haberse seleccionado en ausencia de este agente quimioterapéutico. En este sentido, podrían haberse producido posteriores mutaciones complementarias para ajustar la afinidad por PABA de la molécula DHPS alterada que den como resultado la fijación de las mutaciones originales que confieren resistencia a sulfamidas (Andersson, 2006).

A pesar de que la emergencia y el mantenimiento de dicha mutación en *Leptospiraceae* puede haberse dado de forma fortuita, la transferencia y mantenimiento del gen en la familia *Rhodobiaceae* sugiere que podría suponer alguna ventaja selectiva antes de la introducción de sulfonamidas. Sin embargo, las sulfamidas son poco comunes en la naturaleza y únicamente se han reportado ocho moléculas diferentes hasta la fecha (Petkowski et al., 2018). A pesar de que dos de ellas muestran actividad antibacteriana, su modo de acción y su diana molecular son completamente diferentes a las que se usan en clínica (Baunach et al., 2015).

En segundo lugar, y en marcado contraste con los genes *sul*, el análisis realizado para los genes que confieren resistencia clínica a trimetoprim pone de manifiesto una mayor diversidad en los orígenes cromosómicos de los genes *dfr*. Los genes cromosómicos identificados varían enormemente y abarcan varios genes *folA* cromosómicos resistentes, como en el caso de las sulfamidas, así como susceptibles. De este modo, los datos presentados en esta memoria sugieren que existen dos procesos evolutivos alternativos que conducen a la aparición de genes móviles que confieren resistencia clínica a trimetoprim.

Por un lado, y a semejanza con el caso de la resistencia a las sulfamidas, puede producirse la movilización de genes *folA* resistentes que son preexistentes a la introducción del trimetoprim. La resistencia a trimetoprim generada por los genes *folA* cromosómicos de dos géneros diferentes de *Bacteroidetes* (*Flavobacterium* y *Fluviicola* divergidos desde hace más de 500 millones de años), de dos especies

distintas de *Alcanivorax* y de *Bacillus* subraya el carácter ancestral de las mutaciones cromosómicas que producen resistencia a trimetoprim. Por otra parte, nuevas mutaciones *folA* que confieren resistencia a trimetoprim pueden surgir en especies ambientales tras la exposición a este compuesto y movilizarse (por ejemplo, los genes *dfrA39-dfrA41* encontrados en *Acinetobacter* o el gen S1-DHFR de *S. aureus*) (Dale et al., 1995).

Este último escenario pone de manifiesto que las mutaciones que generan resistencia a trimetoprim ocurren con suficiente frecuencia en entornos clínicos (*Acinetobacter* y *Staphylococcus* son microorganismos clínicamente relevantes) para ser seleccionados y movilizados tras la exposición a trimetoprim. Está ampliamente documentado que la resistencia a trimetoprim, mediada por mutaciones en el gen *folA* cromosómico, se desarrolla muy rápidamente y de manera bastante estructurada (Toprak et al., 2011; Vickers et al., 2009; Watson et al., 2007), mientras que el aislamiento de cepas mutantes resistentes a las sulfamidas son más difíciles de obtener en un laboratorio a la vez que generalmente presentan una afinidad significativamente menor para el PABA, lo que resulta en una disminución de *fitness* en ausencia de sulfamidas que puede aliviarse con la aparición de mutaciones compensatorias posteriores (Griffith et al., 2018; Swedberg et al., 1993). Además, como ya se ha indicado previamente, al contrario de lo que ocurre con las sulfamidas, la sobreexpresión del gen *folA* produce resistencia parcial al trimetoprim y este tipo de mutaciones son las que primero aparecen en experimentos de evolución dirigida (Toprak et al., 2011). Por consiguiente, la capacidad de obtener resistencia parcial a través de la sobreexpresión proporciona un trampolín para la acumulación gradual y el refinamiento de mutaciones que confieren una resistencia sustancial con un coste de *fitness* menor y, por tanto, facilita el desarrollo de resistencia a trimetoprim (Toprak et al., 2011; Watson et al., 2007).

El mantenimiento de mutaciones ancestrales que han originado las variantes móviles que confieren resistencia clínica a las sulfamidas y al trimetoprim es difícil de explicar puesto que, como ya ha sido mencionado, no se

han aislado aún compuestos naturales de estas familias que inhiban la DHPS o la DHFR. El mantenimiento de la resistencia ancestral frente sulfamidas y trimetoprim puede ser consecuencia de un efecto secundario de las mutaciones que proporcionen ciertos beneficios y que aumenten la *fitness* bacteriana como ha sido propuesto para los genes *qnr* que confieren resistencia a quinolonas (Nordmann and Poirel, 2005). Como ya se ha indicado previamente, las proteínas Qnr se unen a la DNA girasa, diana molecular de las quinolonas, y disminuyen la unión de las quinolonas generando resistencia (Tran et al., 2005). Se ha determinado que los orígenes cromosómicos de los genes *qnrA* y *qnrS* son los microorganismos acuáticos *S. algae* y *V. splendidus*, respectivamente (Cantón, 2009). Se ha planteado la hipótesis de que estos genes *qnr* ancestrales pueden haber evolucionado para proporcionar resistencia contra otros compuestos naturales que inhiben la DNA girasa, como la microcina B17 (Heddle et al., 2001), como elementos que facilitan o modulan la función normal de la DNA girasa (Aminov and Mackie, 2007), o como mecanismos para facilitar la adaptación de *Shewanella* a ambientes fríos (Kim et al., 2011). En este contexto, las mutaciones cromosómicas que generan resistencia ancestral a las sulfamidas y al trimetoprim podrían haberse mantenido originalmente como un mecanismo para mejorar ciertos aspectos de la síntesis del folato, para proteger a la DHPS o DHFR de antibióticos desconocidos o para cualquier otra función no relacionada.

4.2.2 Movilización de las variantes genéticas causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral apoyan un escenario evolutivo en el que los genes *folP* cromosómicos resistentes a sulfamidas o bien genes *folA* cromosómicos resistentes a trimetoprim se movilizaron independientemente dando lugar a los genes móviles *sul* y *dfrA* que confieren resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim, respectivamente. Adicionalmente,

los resultados obtenidos en este trabajo indican que nuevas mutaciones que confieren resistencia al trimetoprim se pueden seleccionar y movilizar rápidamente como consecuencia del extensivo uso de este agente antimicrobiano.

La rápida movilización y diseminación de genes que confieren resistencia a los antibióticos y agentes quimioterapéuticos como consecuencia del uso clínico o agrícola de estos compuestos han sido ampliamente documentadas (Aminov and Mackie, 2007; Stokes and Gillings, 2011). La movilización y la propagación de genes de resistencia pueden estar mediadas por plásmidos que codifican transposones e integrones, así como por ICE (Integrative Conjugative Elements), islas de patogenicidad móviles y bacteriófagos, pero el principio común es que la exposición sostenida de las poblaciones bacterianas a antibióticos o agentes quimioterapéuticos induce una fuerte presión selectiva que selecciona la movilización de genes de resistencia (Stokes and Gillings, 2011).

En este sentido, el uso generalizado e intensivo de las sulfamidas en agricultura, acuicultura y la cría de animales desde mediados de los sesenta, y su persistencia en el suelo y en las comunidades acuáticas donde abundan las bacterias de las familias *Leptospiraceae* y *Rhodobiaceae*, han creado un escenario idóneo para la propagación de genes *folP* cromosómicos resistentes a sulfamidas dentro de estas comunidades bacterianas y la posterior transferencia de estos determinantes de resistencia móvil a otros grupos bacterianos. En el caso de los genes *folP* cromosómicos identificados en *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae*, de los que derivan, respectivamente, los genes *sul1-2* y *sul3* clínicos (Figura 4.1), los resultados obtenidos en este estudio indican que se han producido frecuentemente movilizaciones adicionales de estos genes cromosómicos.

Por ejemplo, el gen *folP* de la familia *Rhodobiaceae* fue incorporado en algún momento por la actinobacteria *Amycolaptosis*, que alberga tres genes *folP*. Del mismo modo, se ha detectado en este análisis un plásmido ampliamente extendido en bacterias del género *Azospirillum*, miembros de la clase *Alphaproteobacteria*, que contiene un gen *folP* flanqueado por los genes *flhB* y *glmM*. Curiosamente, este gen *folP* no contiene el motivo Sul, indicando que su movilización ocurrió

independientemente de la que dio lugar a *sul1* y *sul2*. De forma más significativa, una secuencia genómica parcial de un aislado de *P. aeruginosa* alberga un gen *folP* con elevada similitud de secuencia y entorno genético con bacterias de la familia *Rhodobiaceae* (van Belkum et al., 2015). Los genes codificados *upstream* y *downstream* de dicho *folP*, que contiene el motivo Sul, codifican un regulador transcripcional de la familia TetR y la ya mencionada mutasa GlnM. Estos tres genes están flanqueados a su vez por transposasas de la familia IS91 e ISL3. Es importante destacar que la transposasa IS91 contiene motivos de secuencia similares y comparte identidad terminal con los elementos ISCR, que están presentes en los plásmidos que albergan *sul1* y *sul2* (Toleman et al., 2006; Toleman and Walsh, 2011). Este hecho, juntamente con que presenta una similitud mayor con el *folP* de *Rhodobiaceae* que *sul1* y *sul2*, indica que este gen podría representar un paso intermedio de la movilización del *folP* de las bacterias de la familia *Rhodobiaceae*. Asimismo, se ha postulado la movilización del gen *folP* cromosómico de bacterias del género *Chloroflexi* recientemente como el origen probable del gen *sul4* (Razavi et al., 2017), aunque aún no se han aportado datos sobre si confiere resistencia a sulfamidas. En conjunto, lo que parece evidente es que poco después de la introducción clínica de sulfamidas, los genes *sul* fueron diseminados rápidamente en una variedad enorme de elementos móviles.

En el caso del trimetoprim, la filogenia de DHFR revela eventos múltiples de movilización que dan lugar a los genes *dfrA* móviles que confieren resistencia clínica a trimetoprim en la que la gran mayoría de DfrA conocidos se correlacionan con dos *clusters* bien soportados y distintos que probablemente tienen dos orígenes diferentes aun no identificados. El primer *cluster*, tipificado por DfrA1 y DfrA12, incluye 22 DHFR móviles previamente reportados, divididos en dos subgrupos (que contienen 17 y 5 genes *dfrA*, respectivamente) y asociados con patógenos de la clase *Gammaproteobacteria*. Este *cluster* incluye en la base un conjunto de secuencias asociadas a Firmicutes de la que se destaca el gen *dfrF* de *C. difficile*. El segundo *cluster*, representado por DfrA18, comprende un grupo de seis secuencias

altamente divergidas encontradas en especies de patógenos de la clase *Gammaproteobacteria*.

No obstante, el análisis filogenético llevado a cabo a lo largo de este trabajo ha permitido identificar varios genes *folA* cromosómicos asociados a los genes móviles *dfrA*. El gen *dfrA26* se identificó en un aislado clínico de *K. pneumoniae* (PMID: 17307981) y el gen *folA* cromosómico, más estrechamente asociado es un miembro del género *Alcanivorax*. La topología del *cluster* de *dfrA26* y los resultados de reconstrucción del estado ancestral sugieren que este gen móvil surgió a través de la movilización de un gen *folA* cromosómico dentro del orden *Oceanospirillales* (Figura 4.1). Los genes *dfrDGK* se han identificado, respectivamente, en *E. faecalis*, *E. faecium* y *S. aureus*, y los resultados de la reconstrucción del estado ancestral indican que estos genes móviles *dfrA* se originaron mediante la movilización de un miembro del género *Bacillus*, relacionado filogenéticamente con los microorganismos que hospedan los genes móviles *dfrDGK* (Figura 4.1). Del mismo modo, los genes *dfrA39-41* identificados en *Acinetobacter* y el gen S1-DHFR identificado en el Tn4003 de *S. aureus* se originaron a partir de la movilización de genes *folA* cromosómicos codificados en el género *Acinetobacter* y *S. epidermidis*, respectivamente (Figura 4.1). En estos casos, por tanto, la evidencia filogenética y la similitud en el porcentaje GC entre los genes cromosómicos y móviles apuntan hacia un evento de movilización que permanece circunscrito a bacterias taxonómicamente relacionadas.

Por el contrario, el gen *dfrA20* identificado en *Pasteurella multocida* (Kehrenberg and Schwarz, 2005), cuyo gen *folA* cromosómico más relacionado está codificado en *Fluviicola*, una bacteria del filo *Bacteroidetes*, sugiere un evento de movilización mucho más distante (Figura 4.1). En la misma línea, la topología del árbol filogenético y la reconstrucción del estado ancestral asociado sugiere que el gen *dfrA38*, identificado en este trabajo en un plásmido conjugativo de *A. baumannii*, se originó a través de la movilización de un gen *folA* cromosómico dentro del filo *Bacteroidetes* (relacionado con bacterias del género *Flavobacterium*) (Figura 4.1).

Es conveniente señalar que todos los orígenes cromosómicos resistentes identificados parecen preservar esta característica a nivel de género (*Alcanivorax*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Fluviicola*) y corresponden a géneros de bacterias ambientales (principalmente acuáticas), de forma similar a lo ya comentado con respecto a bacterias del suelo y de agua subterránea como posibles fuentes de genes clínicos de resistencia a las sulfamidas. Este hecho sugiere que el uso intensivo de sulfamidas y trimetoprim en la agricultura, la acuicultura y la cría de animales en los últimos cincuenta años puede haber actuado como un detonador para la selección y movilización de genes *folA* y *folP* preexistentes que confieren resistencia a trimetoprim y sulfamida. Sin embargo, también se han identificado dos géneros bacterianos que presentan genes *folA* susceptibles al trimetoprim como origen de genes móviles. En este caso, se trata de dos bacterias clínicas (*Acinetobacter* y *Staphylococcus*) que se encuentran en ambientes altamente expuestos al trimetoprim y que, por tanto, se puede hipotetizar que, una vez producidas, las mutaciones que comportan resistencia se seleccionaron con mucha rapidez ya sea inmediatamente antes o después de la movilización.

El análisis filogenético llevado a cabo en este trabajo permitió identificar en *Enterobacteriaceae* un *cluster* bien definido de plásmidos crípticos derivados del fago de *Salmonella* SSU5 (Kim et al., 2011; Octavia et al., 2015). Los bacteriófagos pueden transferir cantidades sustanciales de material genético a través de la transducción, y el surgimiento de la metagenómica (Balcazar, 2014), ha hecho aumentar su relevancia como posible reservorio de genes de resistencia a los antibióticos. Sin embargo, estudios recientes han reportado que muchos de los posibles genes de resistencia codificados por bacteriófagos en realidad no la confieren (Enault et al., 2017). No obstante, es frecuente encontrar genes que codifican DHFR en ciertas familias de bacteriófagos, a menudo en combinación con el gen *thyA* que codifica la timidilato sintasa, aunque su función en la biología del bacteriófago aun no se conoce por completo (Asare et al., 2015). Estudios preliminares con el bacteriófago T4 han demostrado que los productos de sus genes *thyA* y *folA* son funcionales (Kozloff et al., 1977), aunque la posibilidad de

que puedan conferir resistencia a trimetoprim aun no se ha estudiado. Por tanto, la detección de homólogos de DHFR en genomas de bacteriófagos y plásmidos crípticos que no confieren resistencia al trimetoprim refuerza la idea que la captación de estos genes por parte de los bacteriófagos va destinada a la síntesis de deoxinucleótidos. No obstante, y como se ha reportado recientemente en el fago DLP4 de *Stenotrophomonas maltophilia* algunos de estos genes pueden conferir resistencia parcial a trimetoprim como consecuencia de la sobreexpresión de *folA* (Peters et al., 2019).

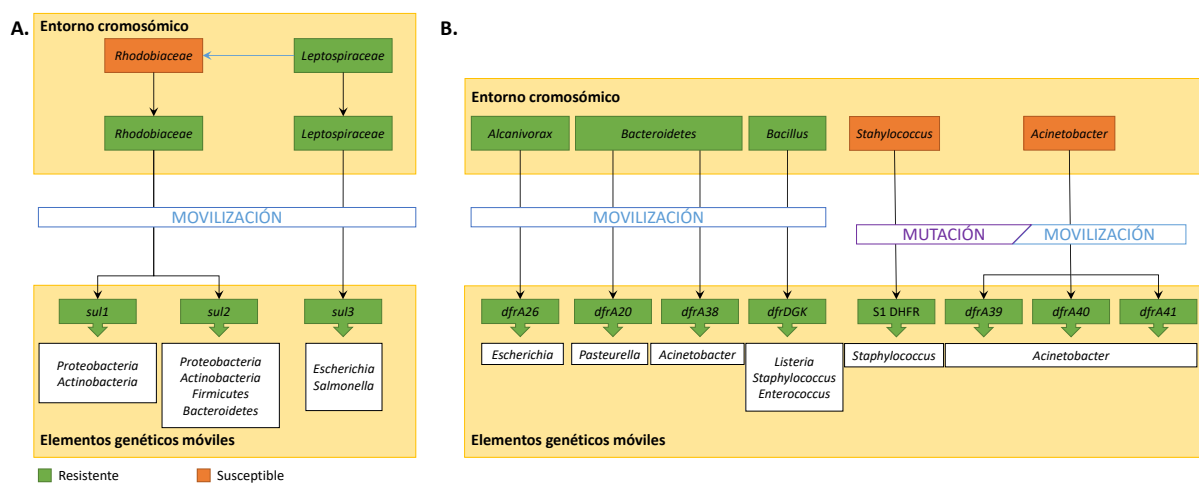


Figura 4.1. Representación esquemática de los procesos evolutivos propuestos que conducen a la diseminación de los genes que confieren resistencia clínica a las sulfamidas (A) y al trimetoprim (B).

4.2.3 Evaluación de la diseminación de los genes móviles causantes de la resistencia clínica a sulfamidas y trimetoprim

El análisis de las secuencias de los genes móviles que confieren resistencia a sulfamidas y a trimetoprim revela un grado inesperado de heterogeneidad en el porcentaje GC. Como ya se ha mencionado con anterioridad, la gran mayoría de DfrA con relevancia clínica se enmarcan filogenéticamente en dos *clusters*. El primer *cluster* está dividido en dos subgrupos, representados por DfrA1 y DfrA12, respectivamente; que incluye además un conjunto de secuencias, tipificadas por

DfrF, asociadas a Firmicutes en la parte basal. El segundo *cluster*, representado por DfrA18, comprende un grupo de secuencias altamente divergidas.

En el primer *cluster*, los homólogos de *dfrA* que se encuentran en la base, incluido el gen *dfrF* de *C. difficile*, muestran un contenido GC relativamente bajo que coincide con el de los Firmicutes en los que han sido reportados. De forma similar, los genes *dfrA* en el subgrupo del *dfrA12* muestran un porcentaje GC que está en línea con el de los aislados de enterobacterias que los albergan. Por el contrario, el subgrupo más grande, que abarca *dfrA1*, muestra un contenido GC sustancialmente más bajo al porcentaje GC de las enterobacterias portadoras de los elementos móviles que los contienen. Esta misma situación se puede apreciar en el segundo *cluster*, el representado por *dfrA18*, que también muestra un menor contenido GC de lo esperado para las enterobacterias.

Para determinar si este patrón de heterogeneidad de porcentaje GC se extiende a otros genes, se comparó el contenido GC de los genes *dfrA* y *sul* con el porcentaje GC del genoma de la especie hospedadora que alberga los correspondientes genes móviles. Los resultados revelaron que el contenido GC de los genes *dfrA* tienden a alinearse con el contenido GC del genoma del hospedador, mientras que el contenido GC de los genes *sul* es esencialmente independiente del genoma del hospedador. En este último caso, se encuentran dos grupos con un porcentaje GC muy diferente. Se comprobó que al eliminar las secuencias redundantes (<90%) aumenta significativamente la correlación del contenido GC de los genes *dfrA* con el genoma del hospedador. En el caso de los genes *sul* no se pueden extraer conclusiones tan rotundas dado que el número de secuencias no redundantes es de cuatro (un representante de las familias *sul1* y *sul2* y dos representantes de la familia *sul3*). El hecho que el contenido GC los genes *dfrA* se alinee con el contenido del genoma del hospedador podría sugerir que el porcentaje GC de los genes *dfrA* se equilibra, por sesgo mutacional, con el del hospedador o, alternativamente, que el gen *dfrA* se originó mediante la movilización de un gen *folA* cromosómico de una bacteria filogenéticamente relacionada con el hospedador actual. Los resultados obtenidos muestran que,

además de la similitud del contenido GC, los genes *dfrA* también codifican proteínas con una similitud de secuencia significativa con la proteína F_{olA} de sus hospedadores. Este hecho sugiere que la mayoría de los genes *dfrA* móviles todavía están asociados con especies del mismo grupo filogenético en el que se originaron. El resto de genes *dfrA* (es decir, aquellos que tienen una identidad superior al 90%) muestran una distribución de contenido GC que es esencialmente independiente del genoma del hospedador, como en el caso de los genes *sul*. Este hecho indica que los grandes grupos de genes *dfrA* se han extendido ampliamente y rápidamente a través de los diferentes clados bacterianos no relacionados filogenéticamente, principalmente a través de la asociación con elementos genéticos móviles que están ampliamente diseminados entre bacterias clínicamente relevantes.

Este análisis pone también de manifiesto la presencia de múltiples *dfrA* con una elevada divergencia en el porcentaje GC y secuencia en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* analizados. Dicha divergencia sugiere que se originaron a través de múltiples eventos de movilización de un conjunto diverso de genes *folA* codificados cromosómicamente y, su presencia en este tipo de microorganismos destaca la capacidad que presentan los genes de resistencia movilizados para alcanzar patógenos clínicamente relevantes.

Finalmente, estos datos respaldan la noción de que, a diferencia de los genes que generan resistencia a sulfamidas, la resistencia a trimetoprim ha surgido varias veces, se ha movilizado repetidamente entre especies estrechamente relacionadas y se ha integrado con éxito en elementos genéticos móviles hasta alcanzar en múltiples ocasiones cepas de importancia clínica.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

- i. El producto de los genes móviles *sul1*, *sul2* y *sul3* que confieren resistencia a las sulfamidas en cepas clínicas, así como de los genes *folP* cromosómicos de las familias *Rhodobiaceae* y *Leptospiraceae* se caracterizan por la presencia de una inserción (motivo Sul) de dos aminoácidos (Phe y Leu/Val) en una región conservada de la proteína responsable de la resistencia a dichos antibacterianos.
- ii. El motivo Sul se originó una única vez en el gen *folP* cromosómico de un miembro de la familia *Leptospiraceae* y posteriormente fue incorporado por un ancestro de la familia *Rhodobiaceae* a través de un evento de transferencia lateral acaecido aproximadamente hace unos 500 millones de años.
- iii. Los genes *sul1* y *sul2* contenidos en elementos genéticos móviles surgen de un evento de transferencia lateral del gen *folP* cromosómico codificado en la familia *Rhodobiaceae*, mientras que el gen móvil *sul3* surgió como consecuencia de la movilización del gen *folA* cromosómico codificado en la familia *Leptospiraceae*.
- iv. La resistencia a sulfamidas determinada por los genes *folP* cromosómicos portadores de la inserción Sul es un fenómeno ancestral y anterior al uso clínico de este antibacteriano. Eventos sucesivos de transferencia lateral de dichos genes conjuntamente con la presión selectiva ejercida por la utilización masiva de dicho quimioterápico han facilitado la selección y diseminación de esta resistencia.

CONCLUSIONES

- v. La mayoría de genes *dfrA* codificados en elementos genéticos móviles (*dfrA20*, *dfrA26*, *dfrA38* y *dfrDGK*) provienen de eventos de transferencia lateral independientes de genes *folA* cromosómicos (*Fluviicola*, *Alcanivorax*, *Flavobacterium* y *Bacillus*, respectivamente) que ya determinaban en su origen resistencia a dicho antibacteriano.
- vi. Los genes móviles *dfrA39*, *dfrA40* y *dfrA41*, identificados en este trabajo, y que confieren resistencia a trimetoprim en el patógeno nosocomial *A. baumannii*, provienen de la movilización del gen *folA* cromosómico de bacterias de este género bacteriano que no determina resistencia a trimetoprim. El fenotipo de resistencia codificado por dichos genes *dfrA* debió originarse inmediatamente antes o después de la movilización.
- vii. La resistencia a trimetoprim mediada por elementos móviles se puede explicar por dos procesos independientes y complementarios: i) la transferencia lateral de genes *folA* cromosómicos ancestrales portadores de una mutación responsable de dicha resistencia, originada en ausencia del agente quimioterápico, y ii) la movilización de genes mutantes espontáneos *folA* cromosómicos, presentes en una población bacteriana coetánea, junto con la exposición al citado antibacteriano y la consiguiente selección.
- viii. Los genes homólogos de *folA/dfr*, codificados en ciertas familias de bacteriófagos no confieren resistencia a trimetoprim. Este hecho revela que la captación de dichos genes por parte de los bacteriófagos tiene la finalidad de facilitar la síntesis de nucleótidos necesarios para su replicación y no contribuye a la diseminación de genes de resistencia.

- ix. El diseño de nuevos antibacterianos sintéticos debe ir acompañado de un rastreo sistemático del pangenoma bacteriano para identificar preventivamente la posible existencia de variantes genéticas que confieran resistencia a estos nuevos compuestos.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Aarestrup, F.M., 2006. The Origin, Evolution, and Local and Global Dissemination of Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* 339–360.
- Abdelwahab, H., Martin Del Campo, J.S., Dai, Y., Adly, C., El-Sohaimy, S., Sobrado, P., 2016. Mechanism of Rifampicin Inactivation in *Nocardia farcinica*. *PLoS ONE* 11, e0162578.
- Akturk, E., Oliveira, H., Santos, S.B., Costa, S., Kuyumcu, S., Melo, L.D.R., Azeredo, J., 2019. Synergistic Action of Phage and Antibiotics: Parameters to Enhance the Killing Efficacy Against Mono and Dual-Species Biofilms. *Antibiotics (Basel)* 8.
- 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61.
- Albrecht, R., 1977. Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Prog Drug Res* 21, 9–104.
- Aldred, K.J., Kerns, R.J., Osheroff, N., 2014. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 53, 1565–1574.
- Allen, H.K., Trachsel, J., Looft, T., Casey, T.A., 2014. Finding alternatives to antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1323, 91–100.
- Allignet, J., Liassine, N., El Solh, N., 1998. Characterization of a Staphylococcal Plasmid Related to pUB110 and Carrying Two Novel Genes, *vatC* and *vgbB*, Encoding Resistance to Streptogramins A and B and Similar Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1794–1798.
- Allignet, J., Loncle, V., Mazodier, P., el Solh, N., 1988. Nucleotide sequence of a staphylococcal plasmid gene, *vgb*, encoding a hydrolase inactivating the B components of virginiamycin-like antibiotics. *Plasmid* 20, 271–275.

- Allignet, J., Loncle, V., Simenel, C., Delepierre, M., El Solh, N., 1993. Sequence of a staphylococcal gene, *vat*, encoding an acetyltransferase inactivating the A-type compounds of virginiamycin-like antibiotics. *Gene* 130, 91–98.
- Allignet, J., Solh, N. el, 1995. Diversity among the gram-positive acetyltransferases inactivating streptogramin A and structurally related compounds and characterization of a new staphylococcal determinant, *vatB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 2027–2036.
- Alonso, H., Gready, J.E., 2006. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme. *Trends Microbiol.* 14, 236–242.
- Alton, N.K., Vapnek, D., 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn 9. *Nature* 282, 864–869.
- Ambler, R.P., 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 289, 321–331.
- Ambrose, S.J., Hall, R.M., 2019. Novel trimethoprim resistance gene, *dfrA35*, in IncC plasmids from Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1863–1866.
- Aminov, R.I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbio.* 1.
- Aminov, R.I., Mackie, R.I., 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 271, 147–161.
- Amram, E., Mikula, I., Schnee, C., Ayling, R.D., Nicholas, R. a. J., Rosales, R.S., Harrus, S., Lysnyansky, I., 2015. 16S rRNA gene mutations associated with decreased susceptibility to tetracycline in *Mycoplasma bovis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 796–802.
- Andersson, D.I., 2006. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 461–465.
- Andersson, M.I., MacGowan, A.P., 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 Suppl 1, 1–11.
- Antonelli, A., D'Andrea, M.M., Brenciani, A., Galeotti, C.L., Morroni, G., Pollini, S., Varaldo, P.E., Rossolini, G.M., 2018. Characterization of *poxtA*, a novel phenicol-oxazolidinone-tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1763–1769.

- Arakawa, Y., 2020. Systematic research to overcome newly emerged multidrug resistant bacteria. *Microbiol. Immunol.*
- Arroyo, L.A., Herrera, C.M., Fernandez, L., Hankins, J.V., Trent, M.S., Hancock, R.E.W., 2011. The *pmrCAB* Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 3743–3751.
- Asare, P.T., Jeong, T.-Y., Ryu, S., Klumpp, J., Loessner, M.J., Merrill, B.D., Kim, K.-P., 2015. Putative type 1 thymidylate synthase and dihydrofolate reductase as signature genes of a novel Bastille-like group of phages in the subfamily *Spounavirinae*. *BMC Genomics* 16, 582.
- Babakhani, S., Oloomi, M., 2018. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J. Basic Microbiol.* 58, 905–917.
- Baca, A.M., Sirawaraporn, R., Turley, S., Sirawaraporn, W., Hol, W.G., 2000. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* 7,8-dihydropteroate synthase in complex with pterin monophosphate: new insight into the enzymatic mechanism and sulfa-drug action. *J. Mol. Biol.* 302, 1193–1212.
- Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D., 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet.* 6, e1001165.
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145.
- Baker, K.R., Jana, B., Hansen, A.M., Nielsen, H.M., Franzyk, H., Guardabassi, L., 2019. Repurposing Azithromycin and Rifampicin Against Gram-Negative Pathogens by Combination With Peptidomimetics. *Front Cell Infect Microbiol* 9, 236.
- Balcazar, J.L., 2014. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* 10, e1004219.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.-M., Olaitan, A.O., 2016. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 583–591.

REFERENCIAS

- Bassett, E.J., Keith, M.S., Armelagos, G.J., Martin, D.L., Villanueva, A.R., 1980. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* 209, 1532–1534.
- Baunach, M., Ding, L., Willing, K., Hertweck, C., 2015. Bacterial Synthesis of Unusual Sulfonamide and Sulfone Antibiotics by Flavoenzyme-Mediated Sulfur Dioxide Capture. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 54, 13279–13283.
- Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., Kishony, R., 2016. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353, 1147–1151.
- Baysarowich, J., Koteva, K., Hughes, D.W., Ejim, L., Griffiths, E., Zhang, K., Junop, M., Wright, G.D., 2008. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 4886–4891.
- Becker, B., Cooper, M.A., 2013. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem. Biol.* 8, 105–115.
- Becker, S.C., Foster-Frey, J., Donovan, D.M., 2008. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiol. Lett.* 287, 185–191.
- Belete, T.M., 2019. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Human Microbiome Journal* 11, 100052.
- Bellio, P., Mancini, A., Di Pietro, L., Cracchiolo, S., Franceschini, N., Reale, S., de Angelis, F., Perilli, M., Amicosante, G., Spyraakis, F., Tondi, D., Cendron, L., Celenza, G., 2020. Inhibition of the transcriptional repressor LexA: Withstanding drug resistance by inhibiting the bacterial mechanisms of adaptation to antimicrobials. *Life Sci.* 241, 117116.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2018. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 42.
- Bentley, R., 2001. Bartolomeo Gosio, 1863-1944: an appreciation. *Adv. Appl. Microbiol.* 48, 229–250.

- Benveniste, R., Davies, J., 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2276–2280.
- Berglund, B., 2015. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. Infect Ecol Epidemiol 5, 28564.
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A., Wright, G.D., 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. PLoS ONE 7, e34953.
- Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., Chisholm, S.W., 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. Science 343, 183–186.
- Binda, E., Marinelli, F., Marcone, G.L., 2014. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. Antibiotics 3, 572–594.
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.P., Roy, P.H., 1991. Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. J. Bacteriol. 173, 4493–4502.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. 13, 42–51.
- Bojkovic, J., Richie, D.L., Six, D.A., Rath, C.M., Sawyer, W.S., Hu, Q., Dean, C.R., 2016. Characterization of an *Acinetobacter baumannii* *lptD* Deletion Strain: Permeability Defects and Response to Inhibition of Lipopolysaccharide and Fatty Acid Biosynthesis. J Bacteriol 198, 731–741.
- Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., Górski, A., 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Exp. Biol. Med. (Maywood) 231, 366–377.
- Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.-S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R., 1999. A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to

REFERENCIAS

- Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925–929.
- Briggs, C.E., Fratamico, P.M., 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 846–849.
- Brinkac, L., Voorhies, A., Gomez, A., Nelson, K.E., 2017. The Threat of Antimicrobial Resistance on the Human Microbiome. *Microb. Ecol.* 74, 1001–1008.
- Brisson-Noël, A., Courvalin, P., 1986. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene* 43, 247–253.
- Buchy, P., Ascioğlu, S., Buisson, Y., Datta, S., Nissen, M., Tambyah, P.A., Vong, S., 2020. Impact of vaccines on antimicrobial resistance. *International Journal of Infectious Diseases* 90, 188–196.
- Bugg, T.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., Walsh, C.T., 1991. Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry* 30, 2017–2021.
- Burns, C.M., Chan, H.L., DuBow, M.S., 1990. *In vitro* maturation and encapsidation of the DNA of transposable Mu-like phage D108. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6092–6096.
- Bush, K., 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62, e01076-18.
- Bush, K., Bradford, P.A., 2019. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol* 17, 295–306.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211–1233.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104, 901–912.

- Candela, T., Marvaud, J.-C., Nguyen, T.K., Lambert, T., 2017. A *cfr*-like gene *cfr(C)* conferring linezolid resistance is common in *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 496–500.
- Cannatelli, A., D'Andrea, M.M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P., Rossolini, G.M., 2013. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5521–5526.
- Cantón, R., 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 1, 20–25.
- Cantón, R., González-Alba, J.M., Galán, J.C., 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 3, 110.
- Carro, L., 2019. Recent Progress in the Development of Small-Molecule FtsZ Inhibitors as Chemical Tools for the Development of Novel Antibiotics. *Antibiotics (Basel)* 8.
- Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Harris, S.R., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., Corander, J., Bryant, J., Parkhill, J., Nejentsev, S., Horstmann, R.D., Brown, T., Drobniewski, F., 2014. Evolution and transmission of drug resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet* 46, 279–286.
- Cattoir, V., Merabet, L., Legrand, P., Soussy, C.-J., Leclercq, R., 2007. Emergence of a *Streptococcus pneumoniae* isolate resistant to streptogramins by mutation in ribosomal protein L22 during pristinamycin therapy of pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 59, 1010–1012.
- Chain, E., Florey, H.W., Adelaide, M.B., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., Sanders, A.G., 1993. Penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 3–7.
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y.N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M.S.J., Fitzgerald, J.R., Penadés, J.R., 2018. Genome hypermobility by lateral transduction. *Science* 362, 207–212.

REFERENCIAS

- Chen, W., Wang, D., Zhou, W., Sang, H., Liu, X., Ge, Z., Zhang, J., Lan, L., Yang, C.-G., Chen, H., 2016. Novobiocin binding to NalD induces the expression of the MexAB-OprM pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 100, 749–758.
- Chiang, Y.N., Penadés, J.R., Chen, J., 2019. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog* 15, e1007878.
- Chopra, I., Hesse, L., O'Neill, A., 2002. Discovery and development of new anti-bacterial drugs, in: van der Goot, H. (Ed.), *Pharmacochemistry Library, Trends in Drug Research III*. Elsevier, pp. 213–225.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232–260.
- Cook, M., Molto, E., Anderson, C., 1989. Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am. J. Phys. Anthropol.* 80, 137–143.
- Cooper, R.G., Wald, M., 1964. Successful treatment of *Proteus septicaemia* with a new drug trimethoprim. *Med. J. Aust.* 2, 93–96.
- Coque, T.M., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 1999. Characterization of dihydrofolate reductase genes from trimethoprim-susceptible and trimethoprim-resistant strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 141–147.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J.L., Igrejas, G., 2017. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J. Med. Microbiol.* 66, 551–559.
- Couce, A., Briales, A., Rodríguez-Rojas, A., Costas, C., Pascual, A., Blázquez, J., 2012. Genomewide overexpression screen for fosfomicin resistance in *Escherichia coli*: MurA confers clinical resistance at low fitness cost. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2767–2769.
- Courvalin, P., 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42, S25–S34.

- Cox, G., Stogios, P.J., Savchenko, A., Wright, G.D., 2015. Structural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylyltransferase ANT(2'')-Ia. *mBio* 6.
- Crofts, T.S., Sontha, P., King, A.O., Wang, B., Bidy, B.A., Zanolli, N., Gaumnitz, J., Dantas, G., 2019. Discovery and Characterization of a Nitroreductase Capable of Conferring Bacterial Resistance to Chloramphenicol. *Cell Chemical Biology* 26, 559-570.e6.
- Cui, L., Su, X., 2009. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 999–1013.
- Cundliffe, E., Demain, A.L., 2010. Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 643–672.
- Curbete, M.M., Salgado, H.R.N., 2016. A Critical Review of the Properties of Fusidic Acid and Analytical Methods for Its Determination. *Crit Rev Anal Chem* 46, 352–360.
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V.A., Foster, S., Gilmore, B.F., Hancock, R.E.W., Harper, D., Henderson, I.R., Hilpert, K., Jones, B.V., Kadioglu, A., Knowles, D., Ólafsdóttir, S., Payne, D., Projan, S., Shaunak, S., Silverman, J., Thomas, C.M., Trust, T.J., Warn, P., Rex, J.H., 2016. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis* 16, 239–251.
- Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R., Hasegawa, M., 1995. A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1835–1841.
- Dale, G.E., Broger, C., Hartman, P.G., Langen, H., Page, M.G., Then, R.L., Stüber, D., 1995. Characterization of the gene for the chromosomal dihydrofolate reductase (DHFR) of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990: the origin of the trimethoprim-resistant S1 DHFR from *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol.* 177, 2965–2970.
- Davenport, D., 2012. The war against bacteria: how were sulphonamide drugs used by Britain during World War II? *Med Humanit* 38, 55–58.

REFERENCIAS

- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433.
- Davison, J., 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 73–91.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461.
- de Almeida, L.M., de Araújo, M.R.E., Sacramento, A.G., Pavez, M., de Souza, A.G., Rodrigues, F., Gales, A.C., Lincopan, N., Sampaio, J.L.M., Mamizuka, E.M., 2013. Linezolid resistance in Brazilian *Staphylococcus hominis* strains is associated with L3 and 23S rRNA ribosomal mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4082–4083.
- Debroas, D., Siguret, C., 2019. Viruses as key reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. *ISME J* 13, 2856–2867.
- Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K.C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R.T., Hatfull, G.F., Spencer, H., 2019. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.* 25, 730–733.
- Delany, I., Rappuoli, R., De Gregorio, E., 2014. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med* 6, 708–720.
- Depardieu, F., Courvalin, P., 2001. Mutation in 23S rRNA Responsible for Resistance to 16-Membered Macrolides and Streptogramins in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 319–323.
- Deris, Z.Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J., Velkov, T., 2014. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot* 67, 147–151.

- Diaz-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., Mullany, P., 2003. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1430–1432.
- Diner, E.J., Hayes, C.S., 2009. Recombineering reveals a diverse collection of ribosomal proteins L4 and L22 that confer resistance to macrolide antibiotics. *J. Mol. Biol.* 386, 300–315.
- Doi, Y., Wachino, J., Arakawa, Y., 2016. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America* 30, 523–537.
- Domagk, G., 1935. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch med Wochenschr* 61, 250–253.
- Domingues, S., Nielsen, K.M., 2017. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 16–21.
- Doyle, D., McDowall, K.J., Butler, M.J., Hunter, I.S., 1991. Characterization of an oxytetracycline-resistance gene, *otrA*, of *Streptomyces rimosus*. *Mol. Microbiol.* 5, 2923–2933.
- Duggar, B.M., 1948. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 177–181.
- Durand, G.A., Raoult, D., Dubourg, G., 2019. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 53, 371–382.
- Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., Burkholder, P.R., 1947. Chloromycetin, a New Antibiotic From a Soil Actinomycete. *Science* 106, 417.
- Eliopoulos, G.M., Gold, H.S., 2001. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. *Clin Infect Dis* 33, 210–219.
- Eliopoulos, G.M., Thauvin, C., Gerson, B., Moellering, R.C., 1985. *In vitro* activity and mechanism of action of A21978C1, a novel cyclic lipopeptide antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27, 357–362.
- Ellis, H., 2016. The birth of the antibiotic era. *Br J Hosp Med (Lond)* 77, 485.

REFERENCIAS

- Emmerich, R., Löw, O., 1899. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Zeitschr. f. Hygiene.* 31, 1–65.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., Petit, M.-A., 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J* 11, 237–247.
- Enne, V.I., Bennett, P.M., Livermore, D.M., Hall, L.M.C., 2004. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 958–963.
- Erdem, H., Tetik, A., Arun, O., Besirbellioglu, B.A., Coskun, O., Eyigun, C.P., 2011. War and infection in the pre-antibiotic era: the Third Ottoman Army in 1915. *Scand. J. Infect. Dis.* 43, 690–695.
- Ernst, C.M., Peschel, A., 2019. MprF-mediated daptomycin resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 309, 359–363.
- Ettayebi, M., Prasad, S.M., Morgan, E.A., 1985. Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162, 551–557.
- Falagas, M.E., Vouloumanou, E.K., Samonis, G., Vardakas, K.Z., 2016. Fosfomicin. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 321–347.
- Fernandes, P., 2016. Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025437.
- Feßler, A.T., Wang, Y., Wu, C., Schwarz, S., 2018. Mobile macrolide resistance genes in staphylococci. *Plasmid* 99, 2–10.
- Fillgrove, K.L., Pakhomova, S., Schaab, M.R., Newcomer, M.E., Armstrong, R.N., 2007. Structure and mechanism of the genomically encoded fosfomicin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* 46, 8110–8120.
- Fily, F., Jolivet-Gougeon, A., Polard, E., Gicquel, T., Dupont, M., Verdier, M.C., Arvieux, C., 2019. Moxifloxacin-rifampicin combination for the treatment

- of non-staphylococcal Gram-positive orthopedic implant-related infections. *Med Mal Infect* 49, 540–544.
- Findlay, J.S., Flick-Smith, H.C., Keyser, E., Cooper, I.A., Williamson, E.D., Oyston, P.C.F., 2019. Predatory bacteria can protect SKH-1 mice from a lethal plague challenge. *Sci Rep* 9, 7225.
- Flatman, R.H., Eustaquio, A., Li, S.-M., Heide, L., Maxwell, A., 2006. Structure-Activity Relationships of Aminocoumarin-Type Gyrase and Topoisomerase IV Inhibitors Obtained by Combinatorial Biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1136–1142.
- Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10, 226–236.
- Foltzer, M.A., Reese, R.E., 1987. Trimethoprim-Sulfamethoxazole and Other Sulfonamides. *Medical Clinics of North America* 71, 1177–1194.
- Franceschi, F., Kanyo, Z., Sherer, E.C., Sutcliffe, J., 2004. Macrolide resistance from the ribosome perspective. *Curr Drug Targets Infect Disord* 4, 177–191.
- Fujimoto-Nakamura, M., Ito, H., Oyamada, Y., Nishino, T., Yamagishi, J. -i., 2005. Accumulation of Mutations in both *gyrB* and *parE* Genes Is Associated with High-Level Resistance to Novobiocin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 3810–3815.
- Fyfe, C., Grossman, T.H., Kerstein, K., Sutcliffe, J., 2016. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025395.
- Gao, M., Glenn, A.E., Blacutt, A.A., Gold, S.E., 2017. Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function. *Front Microbiol* 8, 1775.
- García, P., Arca, P., Evaristo Suárez, J., 1995. Product of *fosC*, a gene from *Pseudomonas syringae*, mediates fosfomicin resistance by using ATP as cosubstrate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1569–1573.
- Garneau-Tsodikova, S., Labby, K.J., 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med. Chem. Commun.* 7, 11–27.

REFERENCIAS

- Gause, G.F., 1955. Recent Studies on Albomycin, a New Antibiotic. *BMJ* 2, 1177–1179.
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., Haldar, J., 2019. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends Microbiol.* 27, 323–338.
- Giguere, S., 2006. Macrolides, azalides, and ketolides. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 191–205.
- Gillings, M.R., 2014. Integrins: past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277.
- Gleckman, R., Blagg, N., Joubert, D.W., 1981. Trimethoprim: Mechanisms of Action, Antimicrobial Activity, Bacterial Resistance, Pharmacokinetics, Adverse Reactions, and Therapeutic Indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1, 14–19.
- Godtfredsen, W.O., Jahnsen, S., Lorck, H., Roholt, K., Tybring, L., 1962. Fusidic Acid: a New Antibiotic. *Nature* 193, 987–987.
- Gołebiewski, M., Kern-Zdanowicz, I., Zienkiewicz, M., Adamczyk, M., Zylinska, J., Baraniak, A., Gniadkowski, M., Bardowski, J., Cegłowski, P., 2007. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3789–3795.
- Golkar, T., Zieliński, M., Berghuis, A.M., 2018. Look and Outlook on Enzyme-Mediated Macrolide Resistance. *Front Microbiol* 9.
- Gondil, V.S., Harjai, K., Chhibber, S., 2020. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105844.
- Gordillo Altamirano, F.L., Barr, J.J., 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Reviews* 32, e00066-18.
- Gould, K., 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 572–575.

- Gray, D.A., Wenzel, M., 2020. More Than a Pore: A Current Perspective on the In Vivo Mode of Action of the Lipopeptide Antibiotic Daptomycin. *Antibiotics* 9, 17.
- Griesenauer, R.H., Kinch, M.S., 2017. An overview of FDA-approved vaccines & their innovators. *Expert Rev Vaccines* 16, 1253–1266.
- Griffith, E.C., Wallace, M.J., Wu, Y., Kumar, G., Gajewski, S., Jackson, P., Phelps, G.A., Zheng, Z., Rock, C.O., Lee, R.E., White, S.W., 2018. The Structural and Functional Basis for Recurring Sulfa Drug Resistance Mutations in *Staphylococcus aureus* Dihydropteroate Synthase. *Front Microbiol* 9, 1369.
- Griffith, F., 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27, 113–159.
- Grossman, T.H., 2016. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025387.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Gunn, J.S., Lim, K.B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., Miller, S.I., 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 27, 1171–1182.
- Guo, X., Peisker, K., Bäckbro, K., Chen, Y., Koripella, R.K., Mandava, C.S., Sanyal, S., Selmer, M., 2012. Structure and function of FusB: an elongation factor G-binding fusidic acid resistance protein active in ribosomal translocation and recycling. *Open Biol.* 2, 120016.
- Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E., Moniri, R., 2018. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin. Microbiol. Rev.* 31.
- Hall, C.L., 1974. Co-trimoxazole and azathioprine: a safe combination. *Br Med J* 4, 15–16.
- Hamamoto, H., Urai, M., Ishii, K., Yasukawa, J., Paudel, A., Murai, M., Kaji, T., Kuranaga, T., Hamase, K., Katsu, T., Su, J., Adachi, T., Uchida, R., Tomoda,

REFERENCIAS

- H., Yamada, M., Souma, M., Kurihara, H., Inoue, M., Sekimizu, K., 2015. Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nat. Chem. Biol.* 11, 127–133.
- Hanauer, D.I., Graham, M.J., Betancur, L., Bobrownicki, A., Cresawn, S.G., Garlena, R.A., Jacobs-Sera, D., Kaufmann, N., Pope, W.H., Russell, D.A., Jacobs, W.R., Sivanathan, V., Asai, D.J., Hatfull, G.F., 2017. An inclusive Research Education Community (iREC): Impact of the SEA-PHAGES program on research outcomes and student learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 13531–13536.
- Hardy, C.D., Cozzarelli, N.R., 2003. Alteration of *Escherichia coli* Topoisomerase IV to Novobiocin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 941–947.
- Hashemian, S.M., Farhadi, T., Ganjparvar, M., 2018. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *DDDT Volume* 12, 1759–1767.
- Hawkey, P.M., 2015. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *J. Hosp. Infect.* 89, 241–247.
- Hawkins, P.A., Law, C.S., Metcalf, B.J., Chochua, S., Jackson, D.M., Westblade, L.F., Jerris, R., Beall, B.W., McGee, L., 2017. Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A and pleuromutilins in *Streptococcus agalactiae* isolates from the USA. *J Antimicrob Chemother* 72, 1886–1892.
- Heddle, J.G., Blance, S.J., Zamble, D.B., Hollfelder, F., Miller, D.A., Wentzell, L.M., Walsh, C.T., Maxwell, A., 2001. The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J. Mol. Biol.* 307, 1223–1234.
- Heide, L., 2009. The aminocoumarins: biosynthesis and biology. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1241.
- Hendlin, D., Stapley, E.O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A.K., Wolf, F.J., Miller, T.W., Chaiet, L., Kahan, F.M., Foltz, E.L., Woodruff, H.B., Mata, J.M., Hernandez, S., Mochales, S., 1969. Phosphonomycin, a New Antibiotic Produced by Strains of *Streptomyces*. *Science* 166, 122–123.

- Henson, K.E.R., Levine, M.T., Wong, E.A.H., Levine, D.P., 2015. Glycopeptide antibiotics: evolving resistance, pharmacology and adverse event profile. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 13, 1265–1278.
- Holberger, L.E., Hayes, C.S., 2009. Ribosomal protein S12 and aminoglycoside antibiotics modulate A-site mRNA cleavage and transfer-messenger RNA activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 32188–32200.
- Hooper, D.C., Jacoby, G.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance: Mechanisms of quinolone resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1354, 12–31.
- Howell, E.E., 2005. Searching sequence space: two different approaches to dihydrofolate reductase catalysis. *Chembiochem* 6, 590–600.
- Hughes, D., Brandis, G., 2013. Rifampicin Resistance: Fitness Costs and the Significance of Compensatory Evolution. *Antibiotics* 2, 206–216.
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., Sköld, O., 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 279–289.
- Hutton, C.A., Perugini, M.A., Gerrard, J.A., 2007. Inhibition of lysine biosynthesis: an evolving antibiotic strategy. *Mol. Biosyst.* 3, 458–465.
- Jacoby, G.A., Strahilevitz, J., Hooper, D.C., 2014. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiology Spectrum* 2.
- Jain, R., Chen, D., White, R.J., Patel, D.V., Yuan, Z., 2005. Bacterial Peptide deformylase inhibitors: a new class of antibacterial agents. *Curr. Med. Chem.* 12, 1607–1621.
- Jiang, X., Ellabaan, M.M.H., Charusanti, P., Munck, C., Blin, K., Tong, Y., Weber, T., Sommer, M.O.A., Lee, S.Y., 2017. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. *Nat Commun* 8, 15784.
- Johnston, N., Mukhtar, T., Wright, G., 2002. Streptogramin Antibiotics: Mode of Action and Resistance. *CDT* 3, 335–344.
- Jones, D., Metzger, H.J., Schatz, A., Waksman, S.A., 1944. CONTROL OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN EXPERIMENTAL ANIMALS BY STREPTOMYCIN. *Science* 100, 103–105.

REFERENCIAS

- Kagan, F., Grostic, M.F., 1972. Mass spectra of lincomycin, lincomycin analogs and degradation products. *Organic Mass Spectrometry* 6, 1217–1223.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., Kropp, H., 1974. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235, 364–386.
- Kanafani, Z.A., Corey, G.R., 2012. Tedizolid (TR-701): a new oxazolidinone with enhanced potency. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21, 515–522.
- Katayama, Y., Zhang, H.-Z., Chambers, H.F., 2004. PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 453–459.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2005. *dfrA20*, A novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 414–417.
- Khan, A., Miller, W.R., Arias, C.A., 2018. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 16, 269–287.
- Kieffer, N., Poirel, L., Descombes, M.-C., Nordmann, P., 2020. Characterization of FosL1, a plasmid-encoded fosfomicin resistance protein identified in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.02042-19, aac;AAC.02042-19v1.
- Kim, C., Heseck, D., Zajíček, J., Vakulenko, S.B., Mobashery, S., 2006. Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry* 45, 8368–8377.
- Kim, D.-W., Thawng, C.N., Lee, K., Wellington, E.M.H., Cha, C.-J., 2019. A novel sulfonamide resistance mechanism by two-component flavin-dependent monooxygenase system in sulfonamide-degrading actinobacteria. *Environment International* 127, 206–215.
- Kim, H.B., Park, C.H., Gavin, M., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2011. Cold shock induces *qnrA* expression in *Shewanella algae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 414–416.
- Kirby, W.M., 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 99, 452–453.

- Kitchin, J.E., Pomeranz, M.K., Pak, G., Washenik, K., Shupack, J.L., 1997. Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37, 445–449.
- Klieve, A.V., Yokoyama, M.T., Forster, R.J., Ouwerkerk, D., Bain, P.A., Mawhinney, E.L., 2005. Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4248–4253.
- Kotra, L.P., Mobashery, S., 1999. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 47, 211–216.
- Kozloff, L.M., Lute, M., Crosby, L.K., 1977. Bacteriophage T4 virion baseplate thymidylate synthetase and dihydrofolate reductase. *J. Virol.* 23, 637–644.
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a027029.
- Krulwich, T.A., Jin, J., Guffanti, A.A., Bechhofer, H., 2001. Functions of tetracycline efflux proteins that do not involve tetracycline. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 237–246.
- Kuzuyama, T., Kobayashi, S., O'Hara, K., Hidaka, T., Seto, H., 1996. Fosfomicin monophosphate and fosfomicin diphosphate, two inactivated fosfomicin derivatives formed by gene products of *fomA* and *fomB* from a fosfomicin producing organism *Streptomyces wedmorensis*. *J. Antibiot.* 49, 502–504.
- Lahlaoui, H., Ben Haj Khalifa, A., Ben Moussa, M., 2014. Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Med Mal Infect* 44, 400–404.
- Landy, M., Larkum, N.W., Oswald, E.J., Streightoff, F., 1943. Increased synthesis of p-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 97, 265–267.
- Lannergard, J., Norstrom, T., Hughes, D., 2009. Genetic Determinants of Resistance to Fusidic Acid among Clinical Bacteremia Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 2059–2065.

REFERENCIAS

- Larsson, D.G.J., 2014. Antibiotics in the environment. *Ups. J. Med. Sci.* 119, 108–112.
- Leclercq, R., 2002. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* 34, 482–492.
- Lee, Y.H., Helmann, J.D., 2014. Mutations in the primary sigma factor σA and termination factor rho that reduce susceptibility to cell wall antibiotics. *J. Bacteriol.* 196, 3700–3711.
- Lennox, E.S., 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1, 190–206.
- Lerminiaux, N.A., Cameron, A.D.S., 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can. J. Microbiol.* 65, 34–44.
- Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., Brundage, R.P., 1962. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J Med Pharm Chem* 91, 1063–1065.
- Li, J., Li, B., Wendlandt, S., Schwarz, S., Wang, Y., Wu, C., Ma, Z., Shen, J., 2014. Identification of a novel *vga(E)* gene variant that confers resistance to pleuromutilins, lincosamides and streptogramin A antibiotics in staphylococci of porcine origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 919–923.
- Li, W., Atkinson, G.C., Thakor, N.S., Allas, Ü., Lu, C., Chan, K.-Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K.S., Hauryliuk, V., Frank, J., 2013. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun* 4, 1477.
- Lin, D.M., Koskella, B., Lin, H.C., 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 8, 162–173.
- Liu, G., Olsen, J.E., Thomsen, L.E., 2019. Identification of Genes Essential for Antibiotic-Induced Up-Regulation of Plasmid-Transfer-Genes in Cephalosporin Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 10, 2203.

- Liu, L.-K., Dai, Y., Abdelwahab, H., Sobrado, P., Tanner, J.J., 2018. Structural Evidence for Rifampicin Monooxygenase Inactivating Rifampicin by Cleaving Its Ansa-Bridge. *Biochemistry* 57, 2065–2068.
- Llobet, E., Tomás, J.M., Bengochea, J.A., 2008. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 154, 3877–3886.
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S., Vester, B., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2500–2505.
- Lopatkin, A.J., Huang, S., Smith, R.P., Srimani, J.K., Sysoeva, T.A., Bewick, S., Karig, D.K., You, L., 2016. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics. *Nat Microbiol* 1, 16044.
- Luo, H.-Y., Liu, M.-F., Wang, M.-S., Zhao, X.-X., Jia, R.-Y., Chen, S., Sun, K.-F., Yang, Q., Wu, Y., Chen, X.-Y., Biville, F., Zou, Y.-F., Jing, B., Cheng, A.-C., Zhu, D.-K., 2018. A novel resistance gene, *lnu(H)*, conferring resistance to lincosamides in *Riemerella anatipestifer* CH-2. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 136–139.
- Lupien, A., Gingras, H., Leprohon, P., Ouellette, M., 2015. Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2973–2980.
- Ma, L., Shen, Z., Naren, G., Li, H., Xia, X., Wu, C., Shen, J., Zhang, Q., Wang, Y., 2014. Identification of a novel G2073A mutation in 23S rRNA in amphenicol-selected mutants of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE* 9, e94503.
- Macfarlane, E.L.A., Kwasnicka, A., Hancock, R.E.W., 2000. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 (Pt 10), 2543–2554.
- MacLeod, A.J., Ross, H.B., Ozere, R.L., Digout, Geo., van Rooyen, C.E., 1964. Lincomycin: A New Antibiotic Active Against Staphylococci and Other Gram-Positive Cocci. *Can Med Assoc J* 91, 1056–1060.

REFERENCIAS

- 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. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281.
- Magnet, S., Blanchard, J.S., 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 477–498.
- Marathe, N.P., Berglund, F., Razavi, M., Pal, C., Dröge, J., Samant, S., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2019. Sewage effluent from an Indian hospital harbors novel carbapenemases and integron-borne antibiotic resistance genes. *Microbiome* 7, 97.
- Marshall, C.G., Lessard, I.A., Park, I., Wright, G.D., 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2215–2220.
- Masters, P.A., O'Bryan, T.A., Zurlo, J., Miller, D.Q., Joshi, N., 2003. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Arch Intern Med* 163, 402.
- Maxwell, A., Lawson, D., 2003. The ATP-Binding Site of Type II Topoisomerases as a Target for Antibacterial Drugs. *CTMC* 3, 283–303.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620.
- Mccormick, M.H., Mcguire, J.M., Pittenger, G.E., Pittenger, R.C., Stark, W.M., 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiot Annu* 3, 606–611.
- McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., Smith, J.W., 1952. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)* 2, 281–283.
- McMurry, L.M., Levy, S.B., 1998. Revised sequence of OtrB (*tet347*) tetracycline efflux protein from *Streptomyces rimosus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3050.

- Mechler, L., Bonetti, E.-J., Reichert, S., Flötenmeyer, M., Schrenzel, J., Bertram, R., François, P., Götz, F., 2016. Daptomycin Tolerance in the *Staphylococcus aureus pitA6* Mutant Is Due to Upregulation of the *dlt* Operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2684–2691.
- Medina, E., Pieper, D.H., 2016. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 398, 3–33.
- Mishra, R.P.N., Oviedo-Orta, E., Prachi, P., Rappuoli, R., Bagnoli, F., 2012. Vaccines and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 596–602.
- Modi, S.R., Lee, H.H., Spina, C.S., Collins, J.J., 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499, 219–222.
- Moellering, R.C., 2011. Discovering new antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37, 2–9.
- Moellering, R.C., 1998. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clin. Infect. Dis.* 27 Suppl 1, S135-140; discussion S141-142.
- Moffatt, J.H., Harper, M., Boyce, J.D., 2019. Mechanisms of Polymyxin Resistance, in: Li, J., Nation, R.L., Kaye, K.S. (Eds.), *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*. Springer International Publishing, Cham, pp. 55–71.
- Moffatt, J.H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J.D.F., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., Michael, F.S., Cox, A.D., Adler, B., Nation, R.L., Li, J., Boyce, J.D., 2010. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 4971–4977.
- Mohr, K.I., 2016. History of Antibiotics Research. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 398, 237–272.
- Møller, T.S.B., Liu, G., Boysen, A., Thomsen, L.E., Lüthje, F.L., Mortensen, S., Møller-Jensen, J., Olsen, J.E., 2017. Treatment with Cefotaxime Affects Expression of Conjugation Associated Proteins and Conjugation Transfer Frequency of an IncI1 Plasmid in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 8, 2365.

REFERENCIAS

- Moon, K., Gottesman, S., 2009. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 74, 1314–1330.
- Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., Wright, G.D., 2012. Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes. *Biochemistry* 51, 1740–1751.
- Morgan, R.E., Batot, G.O., Dement, J.M., Rao, V.A., Eadsforth, T.C., Hunter, W.N., 2011. Crystal structures of *Burkholderia cenocepacia* dihydropteroate synthase in the apo-form and complexed with the product 7,8-dihydropteroate. *BMC Struct. Biol.* 11, 21.
- Moura de Sousa, J., Balbontín, R., Durão, P., Gordo, I., 2017. Multidrug-resistant bacteria compensate for the epistasis between resistances. *PLoS Biol.* 15, e2001741.
- Muller, C., Plésiat, P., Jeannot, K., 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1211–1221.
- Muniesa, M., Imamovic, L., Jofre, J., 2011. Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microb Biotechnol* 4, 725–734.
- Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* 4.
- Neoh, H., Cui, L., Yuzawa, H., Takeuchi, F., Matsuo, M., Hiramatsu, K., 2008. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 45–53.
- Nessar, R., Reyrat, J.M., Murray, A., Gicquel, B., 2011. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 66, 1719–1724.

- Nonaka, L., Suzuki, S., 2002. New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant *tet34* in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1550–1552.
- Nordmann, P., Poirel, L., 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 463–469.
- Norström, T., Lannergård, J., Hughes, D., 2007. Genetic and Phenotypic Identification of Fusidic Acid-Resistant Mutants with the Small-Colony-Variant Phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 4438–4446.
- Octavia, S., Sara, J., Lan, R., 2015. Characterization of a large novel phage-like plasmid in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, fnv044.
- O’Hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T., Kono, M., 1989. Purification and characterization of macrolide 2'-phosphotransferase from a strain of *Escherichia coli* that is highly resistant to erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1354–1357.
- Ohnuki, T., Katoh, T., Imanaka, T., Aiba, S., 1985. Molecular cloning of tetracycline resistance genes from *Streptomyces rimosus* in *Streptomyces griseus* and characterization of the cloned genes. *J. Bacteriol.* 161, 1010–1016.
- Ojo, K.K., Ulep, C., Van Kirk, N., Luis, H., Bernardo, M., Leitao, J., Roberts, M.C., 2004. The *mef(A)* gene predominates among seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3451–3456.
- O’Neill, J., 2016. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist.*
- Palmer, A.C., Kishony, R., 2014. Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms. *Nature communications* 5, 4296.
- Park, S.R., Tripathi, A., Wu, J., Schultz, P.J., Yim, I., McQuade, T.J., Yu, F., Arevang, C.-J., Mensah, A.Y., Tamayo-Castillo, G., Xi, C., Sherman, D.H., 2016.

REFERENCIAS

- Discovery of cahuitamycins as biofilm inhibitors derived from a convergent biosynthetic pathway. *Nat Commun* 7, 1–11.
- Passalacqua, K.D., Satola, S.W., Crispell, E.K., Read, T.D., 2012. A Mutation in the PP2C Phosphatase Gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 Clinical Isolate with Reduced Susceptibility to Vancomycin and Daptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 5212–5223.
- Pasternak, Z., Pietrokovski, S., Rotem, O., Gophna, U., Lurie-Weinberger, M.N., Jurkevitch, E., 2013. By their genes ye shall know them: genomic signatures of predatory bacteria. *ISME J* 7, 756–769.
- Peleg, A.Y., Miyakis, S., Ward, D.V., Earl, A.M., Rubio, A., Cameron, D.R., Pillai, S., Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M., 2012. Whole Genome Characterization of the Mechanisms of Daptomycin Resistance in Clinical and Laboratory Derived Isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7, e28316.
- Pelletier, M.R., Casella, L.G., Jones, J.W., Adams, M.D., Zurawski, D.V., Hazlett, K.R.O., Doi, Y., Ernst, R.K., 2013. Unique Structural Modifications Are Present in the Lipopolysaccharide from Colistin-Resistant Strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57, 4831–4840.
- Penadés, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., Novick, R.P., 2015. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 171–178.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., Barbé, J., 2018. Functional Characterization of AbaQ, a Novel Efflux Pump Mediating Quinolone Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62.
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Vallejo, J.A., Rumbo-Feal, S., Bou, G., Aranda, J., Barbé, J., 2017. Mutations in the β -Subunit of the RNA Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.* 85.
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1169–1172.

- Perron, G.G., Whyte, L., Turnbaugh, P.J., Goordial, J., Hanage, W.P., Dantas, G., Desai, M.M., 2015. Functional characterization of bacteria isolated from ancient arctic soil exposes diverse resistance mechanisms to modern antibiotics. *PLoS ONE* 10, e0069533.
- Peters, D.L., McCutcheon, J.G., Stothard, P., Dennis, J.J., 2019. Novel *Stenotrophomonas maltophilia* temperate phage DLP4 is capable of lysogenic conversion. *BMC Genomics* 20, 300.
- Peterson, E., Kaur, P., 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol* 9, 2928.
- Petkowski, J.J., Bains, W., Seager, S., 2018. Natural Products Containing a Nitrogen-Sulfur Bond. *J. Nat. Prod.* 81, 423–446.
- Phillips, O.A., Sharaf, L.H., 2016. Oxazolidinone antimicrobials: a patent review (2012-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26, 591–605.
- Poirel, L., Jayol, A., Nordmann, P., 2017. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 557–596.
- Prats-van der Ham, M., Tatay-Dualde, J., Gómez-Martín, Á., Corrales, J.C., Contreras, A., Sánchez, A., de la Fe, C., 2018. 23S rRNA and L22 ribosomal protein are involved in the acquisition of macrolide and lincosamide resistance in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Vet. Microbiol.* 216, 207–211.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.-P., 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89–92.
- Pyörälä, S., Baptiste, K.E., Catry, B., van Duijkeren, E., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C.M.F., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., Törneke, K., 2014. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *Vet. J.* 200, 230–239.

- Quinlivan, E.P., McPARTLIN, J., Weir, D.G., Scott, J., 2000. Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *The FASEB Journal* 14, 2519–2524.
- Rådström, P., Swedberg, G., Sköld, O., 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1840–1848.
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 13, 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Razavi, M., Marathe, N.P., Gillings, M.R., Flach, C.-F., Kristiansson, E., Joakim Larsson, D.G., 2017. Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome* 5, 160.
- Reis, A.C., Kolvenbach, B.A., Nunes, O.C., Corvini, P.F.X., 2020. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants - part I. *N Biotechnol* 54, 34–51.
- Rello, J., Parisella, F.R., Perez, A., 2019. Alternatives to antibiotics in an era of difficult-to-treat resistance: new insights. *Expert Rev Clin Pharmacol* 12, 635–642.
- Renzoni, A., Andrey, D.O., Jousselin, A., Barras, C., Monod, A., Vaudaux, P., Lew, D., Kelley, W.L., 2011. Whole genome sequencing and complete genetic analysis reveals novel pathways to glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 6, e21577.
- Reynolds, P.E., 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 943–950.
- Ridenhour, M.B., Fletcher, H.M., Mortensen, J.E., Daneo-Moore, L., 1996. A novel tetracycline-resistant determinant, *tet(U)*, is encoded on the plasmid pKq10 in *Enterococcus faecium*. *Plasmid* 35, 71–80.
- Roberts, M.C., 2011. Mechanisms of Bacterial Antibiotic Resistance and Lessons Learned from Environmental Tetracycline-Resistant Bacteria, in: *Antimicrobial Resistance in the Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 93–121.

- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245, 195–203.
- Roberts, M.C., Schwarz, S., 2016. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *J. Environ. Qual.* 45, 576–592.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., Hooper, D.C., 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12, 83–88.
- Roland, K.L., Martin, L.E., Esther, C.R., Spitznagel, J.K., 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* 175, 4154–4164.
- Román, F., Roldán, C., Trincado, P., Ballesteros, C., Carazo, C., Vindel, A., 2013. Detection of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* with 23S rRNA and novel L4 riboprotein mutations in a cystic fibrosis patient in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2428–2429.
- Rosenfeld, N., Bouchier, C., Courvalin, P., Périchon, B., 2012. Expression of the Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by AdeN, a TetR-Type Regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2504–2510.
- Saima, S., Fiaz, M., Zafar, R., Ahmed, I., Arshad, M., 2020. Chapter 6 - Dissemination of antibiotic resistance in the environment, in: Hashmi, M.Z. (Ed.), *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*, Advances in Environmental Pollution Research Series. Elsevier, pp. 99–116.
- Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., Erill, I., 2019. Origin of the Mobile Dihydro-Pterate Synthase Gene Determining Sulfonamide Resistance in Clinical Isolates. *Front Microbiol* 9, 3332.
- Santiago-Rodriguez, T.M., Fornaciari, G., Luciani, S., Dowd, S.E., Toranzos, G.A., Marota, I., Cano, R.J., 2015. Gut Microbiome of an 11th Century A.D. Pre-Columbian Andean Mummy. *PLoS ONE* 10, e0138135.

REFERENCIAS

- Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F., 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814–821.
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., Loessner, M.J., 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol* 7, 1147–1171.
- Schroeder, M.R., Stephens, D.S., 2016. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 519–542.
- Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Brenner Michael, G., Feßler, A.T., Vester, B., 2016. Lincosamides, Streptogramins, Phenicols, and Pleuromutilins: Mode of Action and Mechanisms of Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a027037.
- Sensi, P., 1983. History of the development of rifampin. *Rev. Infect. Dis.* 5 Suppl 3, S402-406.
- Serio, A.W., Keepers, T., Andrews, L., Krause, K.M., 2018. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus* 8.
- Shah, N.J., 2015. Reversing resistance: The next generation antibacterials. *Indian J Pharmacol* 47, 248–255.
- Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., Dharani, S., Onyile, O., Rinaggio, J., Connell, N.D., Kadouri, D.E., 2016. Predatory Bacteria Attenuate *Klebsiella pneumoniae* Burden in Rat Lungs. *mBio* 7.
- Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., Dharani, S., Rinaggio, J., Kadouri, D.E., Connell, N.D., 2017. Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats. *Sci Rep* 7, 1864.
- Shaw, W.V., 1983. Chloramphenicol Acetyltransferase: Enzymology and Molecular Biology. *Critical Reviews in Biochemistry* 14, 1–46.
- Silver, L.L., 2017. Fosfomicin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7.

- Silver, L.L., 2016. Appropriate Targets for Antibacterial Drugs. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a030239.
- Sköld, O., 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. Vet. Res. 32, 261–273.
- Sköld, O., 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. Drug Resistance Updates 3, 155–160.
- SMALL WORLD INITIATIVE: SWI Spain, 2017. . SMALL WORLD INITIATIVE. URL <http://swispain.blogspot.com/2017/07/i-workshop-swispain-2017-el-programa.html> (accessed 2.21.20).
- Smith, R., Coast, J., 2013. The true cost of antimicrobial resistance. BMJ 346, f1493.
- Spanogiannopoulos, P., Thaker, M., Koteva, K., Waglechner, N., Wright, G.D., 2012. Characterization of a Rifampin-Inactivating Glycosyltransferase from a Screen of Environmental *Actinomycetes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 56, 5061–5069.
- Spížek, J., Řezanka, T., 2017. Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. Biochemical Pharmacology, Antibiotics - Meeting the Challenges of 21st Century Health Care: Part I 133, 20–28.
- Stansly, P.G., Shepherd, R.G., White, H.J., 1947. Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. Bull Johns Hopkins Hosp 81, 43–54.
- Stogios, P.J., Cox, G., Spanogiannopoulos, P., Pillon, M.C., Waglechner, N., Skarina, T., Koteva, K., Guarné, A., Savchenko, A., Wright, G.D., 2016. Rifampin phosphotransferase is an unusual antibiotic resistance kinase. Nat Commun 7, 11343.
- Stokes, H.W., Gillings, M.R., 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 35, 790–819.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A., 2009. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clin Microbiol Rev 22, 664–689.

- Suárez, J.E., Mendoza, M.C., 1991. Plasmid-encoded fosfomicin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 791–795.
- Subramanian, G.K., Gnanasoundari, P., Chakraborty, S., Krishnan, P., 2016. Occurrence of aac(6′)-Ib variants among *Enterobacteriaceae*: Is aac(6′)-Ib-cr the most predominant variant? *Indian J Med Microbiol* 34, 400–401.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A.T., Siddiqui, M.T., Mondal, A.H., Haq, Q.M.R., 2018. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Front Microbiol* 9, 2066.
- Swedberg, G., Fermér, C., Sköld, O., 1993. Point mutations in the dihydropteroate synthase gene causing sulfonamide resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 338, 555–558.
- Tagg, K.A., Francois Watkins, L., Moore, M.D., Bennett, C., Joung, Y.J., Chen, J.C., Folster, J.P., 2019. Novel trimethoprim resistance gene *dfrA34* identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 38–41.
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S., Muratani, T., Matsumoto, T., Nakahama, C., Tomono, K., 2010. Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 333–337.
- Tao, W., Lee, M.H., Wu, J., Kim, N.H., Kim, J.-C., Chung, E., Hwang, E.C., Lee, S.-W., 2012. Inactivation of chloramphenicol and florfenicol by a novel chloramphenicol hydrolase. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6295–6301.
- Tennigkeit, J., Matzura, H., 1991. Nucleotide sequence analysis of a chloramphenicol-resistance determinant from *Agrobacterium tumefaciens* and identification of its gene product. *Gene* 98, 113–116.
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D., 2010. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 419–431.
- Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 711–721.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316.

- Toleman, M.A., Walsh, T.R., 2011. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 912–935.
- Tooke, C.L., Hinchliffe, P., Bragginton, E.C., Colenso, C.K., Hirvonen, V.H.A., Takebayashi, Y., Spencer, J., 2019. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* 431, 3472–3500.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.-B., Chait, R., Hartl, D.L., Kishony, R., 2011. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat. Genet.* 44, 101–105.
- Touzé, T., Barreteau, H., El Ghachi, M., Bouhss, A., Barnéoud-Arnoulet, A., Patin, D., Sacco, E., Blanot, D., Arthur, M., Duché, D., Lloubès, R., Mengin-Lecreulx, D., 2012. Colicin M, a peptidoglycan lipid-II-degrading enzyme: potential use for antibacterial means? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1522–1527.
- Toyofuku, M., Nomura, N., Eberl, L., 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 13–24.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5638–5642.
- Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 118–125.
- Tran, T.T., Munita, J.M., Arias, C.A., 2015. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1354, 32–53.
- Trieber, C.A., Taylor, D.E., 2002. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* 184, 2131–2140.
- Trimble, M.J., Mlynářčík, P., Kolář, M., Hancock, R.E.W., 2016. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a025288.
- Tupin, A., Gualtieri, M., Roquet-Banères, F., Morichaud, Z., Brodolin, K., Leonetti, J.-P., 2010. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 519–523.

- van Belkum, A., Soriaga, L.B., LaFave, M.C., Akella, S., Veyrieras, J.-B., Barbu, E.M., Shortridge, D., Blanc, B., Hannum, G., Zambardi, G., Miller, K., Enright, M.C., Mugnier, N., Brami, D., Schicklin, S., Felderman, M., Schwartz, A.S., Richardson, T.H., Peterson, T.C., Hubby, B., Cady, K.C., 2015. Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6, e01796-01715.
- van Hoek, A.H.A.M., Mayrhofer, S., Domig, K.J., Flórez, A.B., Ammor, M.S., Mayo, B., Aarts, H.J.M., 2008. Mosaic tetracycline resistance genes and their flanking regions in *Bifidobacterium thermophilum* and *Lactobacillus johnsonii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 248–252.
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front. Microbiol.* 2.
- van Treeck, U., Schmidt, F., Wiedemann, B., 1981. Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP1) prevalent in clinical *Escherichia coli* strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). *Antimicrob. Agents Chemother.* 19, 371–380.
- Vazquez, D., 1966. Studies on the Mode of Action of the Streptogramin Antibiotics. *Journal of General Microbiology* 42, 93–106.
- Vázquez-Laslop, N., Mankin, A.S., 2018. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences* 43, 668–684.
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277–283.
- Verbist, L., 1990. The antimicrobial activity of fusidic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 25 Suppl B, 1–5.
- Vester, B., 2018. The *cfr* and *cfr*-like multiple resistance genes. *Research in Microbiology* 169, 61–66.
- Vickers, A.A., Potter, N.J., Fishwick, C.W.G., Chopra, I., O'Neill, A.J., 2009. Analysis of mutational resistance to trimethoprim in *Staphylococcus aureus* by genetic and structural modelling techniques. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 1112–1117.

- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolffs, P.F.G., 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7, 173.
- Waglechner, N., Wright, G.D., 2017. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse? *BMC Biol.* 15, 84.
- Wang, X., Wang, Yao, Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., Zhang, S., Shen, J., Shen, Z., Wang, Yang, 2018. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., Zhang, R., Li, J., Zhao, Q., He, T., Wang, D., Wang, Z., Shen, Y., Li, Y., Feßler, A.T., Wu, C., Yu, H., Deng, X., Xia, X., Shen, J., 2015. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2182–2190.
- Watson, M., Liu, J.-W., Ollis, D., 2007. Directed evolution of trimethoprim resistance in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 274, 2661–2671.
- Wendlandt, S., Kadlec, K., Feßler, A.T., Schwarz, S., 2015. Identification of ABC transporter genes conferring combined pleuromutilin–lincosamide–streptogramin A resistance in bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Microbiology* 177, 353–358.
- Werner, G., Klare, I., Heier, H., Hinz, K.-H., Böhme, G., Wendt, M., Witte, W., 2000. Quinupristin/Dalfopristin-Resistant Enterococci of the *satA* (*vatD*) and *satG* (*vatE*) Genotypes from Different Ecological Origins in Germany. *Microbial Drug Resistance* 6, 37–47.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C.J., 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 525–533.
- Wohlkonig, A., Chan, P.F., Fosberry, A.P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., Leydon, V.R., Miles, T.J., Pearson, N.D., Perera, R.L., Shillings, A.J., Gwynn,

REFERENCIAS

- M.N., Bax, B.D., 2010. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1152–1153.
- World Health Organization (Ed.), 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wright, G.D., 2019. Environmental and clinical antibiotic resistomes, same only different. *Curr. Opin. Microbiol.* 51, 57–63.
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 5, 175–186.
- Wright, M.S., Suzuki, Y., Jones, M.B., Marshall, S.H., Rudin, S.D., van Duin, D., Kaye, K., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., Adams, M.D., 2015. Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 536–543.
- Wüthrich, D., Brilhante, M., Hausherr, A., Becker, J., Meylan, M., Perreten, V., 2019. A Novel Trimethoprim Resistance Gene, *dfrA36*, Characterized from *Escherichia coli* from Calves. *mSphere* 4.
- Xiong, L., Kloss, P., Douthwaite, S., Andersen, N.M., Swaney, S., Shinabarger, D.L., Mankin, A.S., 2000. Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action. *J. Bacteriol.* 182, 5325–5331.
- Yamaki, H., 1965. Inhibition of protein synthesis by fusidic and helvolinic acids, steroidal antibiotics. *J. Antibiot.* 18, 228–232.
- Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2004. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J. Biol. Chem.* 279, 52346–52352.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., Arakawa, Y., 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362, 1888–1893.

- Zaw, M.T., Emran, N.A., Lin, Z., 2018. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Public Health* 11, 605–610.
- Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T.L., Cano, R.J., Adams, S., Schuyler, J.A., McMillan, R., Pace, J.L., 2016. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6, a026989.
- Zhang, H.Z., Schmidt, H., Piepersberg, W., 1992. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *lmrA* and *lmrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol. Microbiol.* 6, 2147–2157.
- Zilhao, R., Courvalin, P., 1990. Nucleotide sequence of the *fosB* gene conferring fosfomicin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 267–272.
- Zurenko, G.E., Ford, C.W., Hutchinson, D.K., Brickner, S.J., Barbachyn, M.R., 1997. Oxazolidinone antibacterial agents: development of the clinical candidates eperezolid and linezolid. *Expert Opin Investig Drugs* 6, 151–158.

7. AGRADECIMIENTOS

7. AGRADECIMIENTOS

Aunque las palabras en estos casos no son mi fuerte, en el final de esta etapa querría agradecer a muchas personas la ayuda, colaboración y apoyo que me han prestado a lo largo de estos intensos años y sin los que la presente Tesis no tendría sentido.

En primer lugar, darles las gracias a mis directores de Tesis. Al Dr. Jordi Barbé, por tu gran dedicación y apoyo. Por confiar en mí siempre que tenías alguna de tus ideas, por hacernos reír cuando las cosas no van tan bien como queríamos y por sacarnos las castañas del fuego siempre que ha sido necesario. Al Dr. Ivan Erill, a ti te debo todo lo que sé sobre bioinformática. Quiero agradecer que siempre supieras valorar muy positivamente el trabajo bien hecho, por estar siempre disponible (ya sean las 8 de la mañana o las 2 de la madrugada) para resolver mis dudas, por tu infinita paciencia y por tu cercanía. Ya que, aunque nunca te lo llegué a comentar, en las primeras reuniones que teníamos en el CRAG tenía un miedo espantoso. A la Dra. Montserrat Llagostera, gracias por acogerme cálidamente en el laboratorio desde el primer día que entré como estudiante de Grado, allá por 2014. Gracias por resolver siempre mis dudas, por hacerme pensar y por todas las correcciones. Echaré en falta los “chachi” de primera hora de la mañana...

No me quiero olvidar de la Dra. Pilar Cortés, quien, aunque finalmente no ha formado parte de los directores de Tesis, siempre me ha ayudado como si lo hubiese sido. Pilar, sobre todo mil gracias por el apoyo incondicional y los consejos (no necesariamente profesionales) que me has brindado. A los doctores Jesús Aranda y Susana Campoy, gracias por vuestros útiles consejos y asesoramiento en microbiología molecular cuando lo he necesitado.

Gracias a Susana Escribano y a Joan Ruiz. Por vuestra infinita disponibilidad para ayudar a todos los miembros del grupo. Es sorprendente la cantidad (y calidad) de trabajo que hacéis y que sólo recae en dos personas. Sé que laboralmente os echaré mucho de menos, ya que no es tan común contar con dos personas como vosotros en el trabajo. Pero, por supuesto, os echaré mucho más de

menos personalmente. Joan, espero que sigamos hablando de fútbol y que sigas haciendo de psicólogo personal que tanta falta hace; y Susana, espero que sigas mandándome fotos de chistes “malos”, así como de la Lili y las gatitas.

A la gente del Lab2. Jenni, aunque te escondas tras una máscara de cocodrilo, ha sido genial compartir y solucionar crisis filosóficas de extrema importancia que se nos han ido ocurriendo, así como rezar el “Fago Nuestro” siempre que ha sido necesario. Sin embargo, me voy un poco decepcionado: i) porque al principio me dabas galletas Príncipe y ahora me das comida *realfooder* de esa y; ii) porque creo que nos tendrían que haber otorgado un premio internacional por la ya clásica “lista de los viernes” encabezada por el maestro Paco Pil. También me gustaría agradecer a Julia y Ángela por enseñarme a enseñar (y a delegar), por su enorme capacidad de trabajo y constantes risas. Finalmente, no me querría olvidar de Joan Colom, quien me inició en todo esto y a quien le debó gran parte de lo que sé de trabajo en un laboratorio.

A la gente del Lab1. A Jordi Corral por estar siempre. Sé que tengo menos memoria que un pez, pero ~~supongo que~~ hemos vivido miles de cosas juntos tanto fuera como dentro del laboratorio y no concibo esta Tesis sin ti. Gracias por refunfuñar tanto y por seguirme todas las tonterías “nuevas” que iban saliendo mes tras mes. Echaré de menos el “sonido Corral” después de cada comida. A Eli por recordarme constantemente que hay que reírse de todo y sobretodo de ~~ella~~ uno mismo. Echaré de menos el no poder entrar al laboratorio gritando “Eliiiiiisabet” o no poder seguir contando chistes de esos tan maravillosos. Espero que aprendas a hablar silbando las S y que me invites un día a cenar a tu casa, que ya va siendo hora después de tantos años. También me quería acordar de María, la verdad que en estos últimos años se ha echado en falta tu “dulce” voz, los mapaches, los erizos y los bares de mala muerte. Ojalá hubieses estado en Barcelona hasta hoy. Querría agradecer también a Gabi, con quien he podido compartir menos tiempo, su eterno buen humor y sus enseñanzas en clave mexicana. Y finalmente a Oihane, por introducirme fugazmente en la microscopía.

Además, tampoco me olvido de mis compañeros del Departamento; en especial a Carrasquilla, Eloi, Ferran y Marc Bach por siempre tener un momento para escuchar penas o alegrías y por haber hecho este período de tiempo aún mejor.

A mi padre y a mi madre por enseñarme a nunca renunciar a nada, a ser fuerte y por apretarse el cinturón todo lo que hiciese falta para que pudiese cumplir mis objetivos. Nunca os he agradecido ni os podré agradecer todo lo que hicisteis, hacéis y (sé que) haréis por mí. Sois un ejemplo, gracias por todo. A mi hermana Inés, por ~~meterse conmigo cada día de su vida~~ su sinceridad y por enseñarme a tomarme la vida con otra filosofía. A Alba, por su eterna y contagiosa alegría, por comprender siempre que “no me puedo coger libre este fin de semana” y por enseñarme a que no necesito a nadie más que a mí mismo para romper las barreras que yo me genero. Sin vosotros, esta Tesis no existiría. También me gustaría acordarme de la mujer más fuerte que he conocido nunca, mi abuela Fina. Y, por último, a los que no están. A la “iaia” Mercè, con quién jamás imaginé que no podría compartir este momento cuando empecé el doctorado, lo que lo convierte en algo infinitamente peor. Y a mi abuelo José María, quién fue, es y siempre será mi referente en la vida.

¡Gracias a todos!

