

K. Arbé Carton¹ (Doctorando en Biología Molecular y Biomedicina), C. Garbisu², L. Arana³ y I. Alkorta¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

² Departamento de Conservación de Recursos Naturales, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio

³Departamento de Química Aplicada, Facultad de Químicas, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

RESUMEN

Los plásmidos conjugativos contienen genes de resistencia a antibióticos y se transfieren entre bacterias mediante la conjugación bacteriana, contribuyendo a la diseminación de genes de resistencia.

Conocer los factores que influyen en la conjugación bacteriana ayudaría al control de la aparición de bacterias multirresistentes.

Pero el número de muestras en estos estudios suele ser alto, por lo que en este trabajo presentamos el diseño, desarrollo y validación de una plataforma de alto rendimiento para llevar a cabo un gran número de experimentos de conjugación, utilizando una medida simple y rápida para determinar la eficiencia de conjugación.

INTRODUCCIÓN

Los expertos estiman que para el año 2050 las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos serán la principal causa de mortalidad en el mundo (O'Neill, 2016; Murray et al., 2022). Mediante la transferencia horizontal de genes (HGT) las bacterias aumentan su reservorio genético frente a condiciones adversas. Uno de los procesos principales de HGT que está muy relacionado con la diseminación de genes de resistencia es la conjugación (Álvarez-Rodríguez et al., 2020). Considerando su importancia, un sistema preciso de cuantificación de la frecuencia de conjugación permitiría (i) evaluar el riesgo de diseminación de resistencias tanto en ambientes clínicos como ambientales; (ii) estudiar el impacto de las actividades agropecuarias, contaminantes emergentes y cambio climático (Epelde et al., 2018) en la diseminación de resistencias; y (iii) analizar el efecto de diferentes estrategias en la disminución de este problema.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Conjugación clásica (Cc) → cultivos O/N de donador (D) y receptor (R) se mezclaron (1:1) sobre filtro (0,22 µm) en LB-agar. Tras la incubación, se realizaron diluciones y se seleccionaron los transconjugantes (LB, 10 µg/mL TRI, 50 µg/mL RIF). Al cabo de 24 o 48 h se contaron UFC/mL.

b) Conjugación HTP (CHTP) → Las mezclas de D+R se depositaron sobre los filtros (0,22 µm) de una microplaca de 96 pocillos (Merck, Germany) incubada sobre LB-agar. Tras la incubación, 10 µL se mezclaron con 140 µL de medio selectivo (LB, 10 µg/mL TRI, 50 µg/mL RIF) en otra microplaca de 96 (TC-Platte 96 Well, Standard, R, Sarstedt, Germany) para hacer mediciones de OD₆₀₀ y realizar curvas de crecimiento.

c) Recta de calibrado → Se representaron las UFC/mL de la conjugación clásica y el tiempo necesario para alcanzar una OD₆₀₀ de 0,3 en las curvas de crecimiento de la CHTP.

RESULTADOS

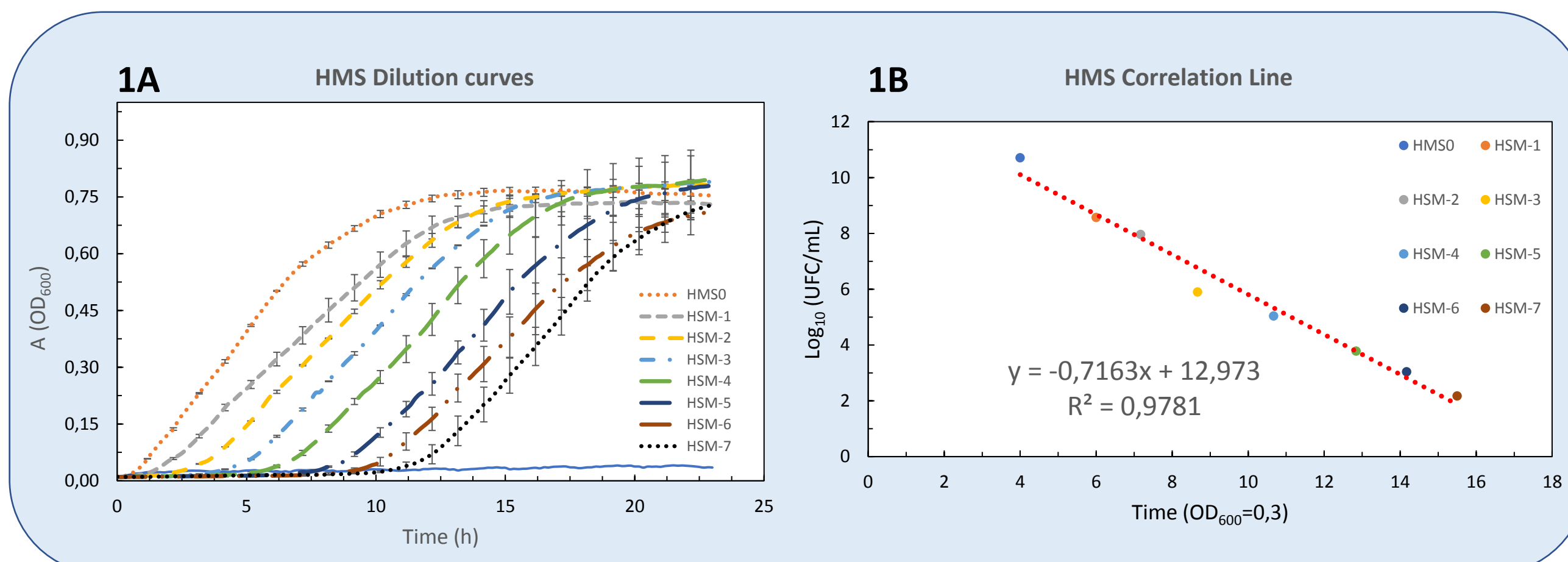


Figura 1. Recta de calibrado para receptor. (1A) Curvas de crecimiento de las diferentes diluciones del receptor (*E. coli* HMS174). Después de la conjugación bacteriana, se realizaron diluciones seriadas del receptor en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos y los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C. Las curvas de crecimiento se obtuvieron registrando los valores de OD₆₀₀ cada 10 min. Para cada dilución se realizaron tres réplicas técnicas. Las barras de error (desviación estándar entre réplicas técnicas) se muestran cada hora. **(1B)** Relación entre Log₁₀ (UFC/mL) y el tiempo al que cada dilución alcanza OD₆₀₀ 0,3 (tOD₆₀₀) para el receptor. El tiempo se obtuvo a partir de las curvas de crecimiento, mientras que el Log₁₀ (UFC/mL) se obtuvo después de sembrar 50 µL de cada dilución del ensayo clásico por triplicado.

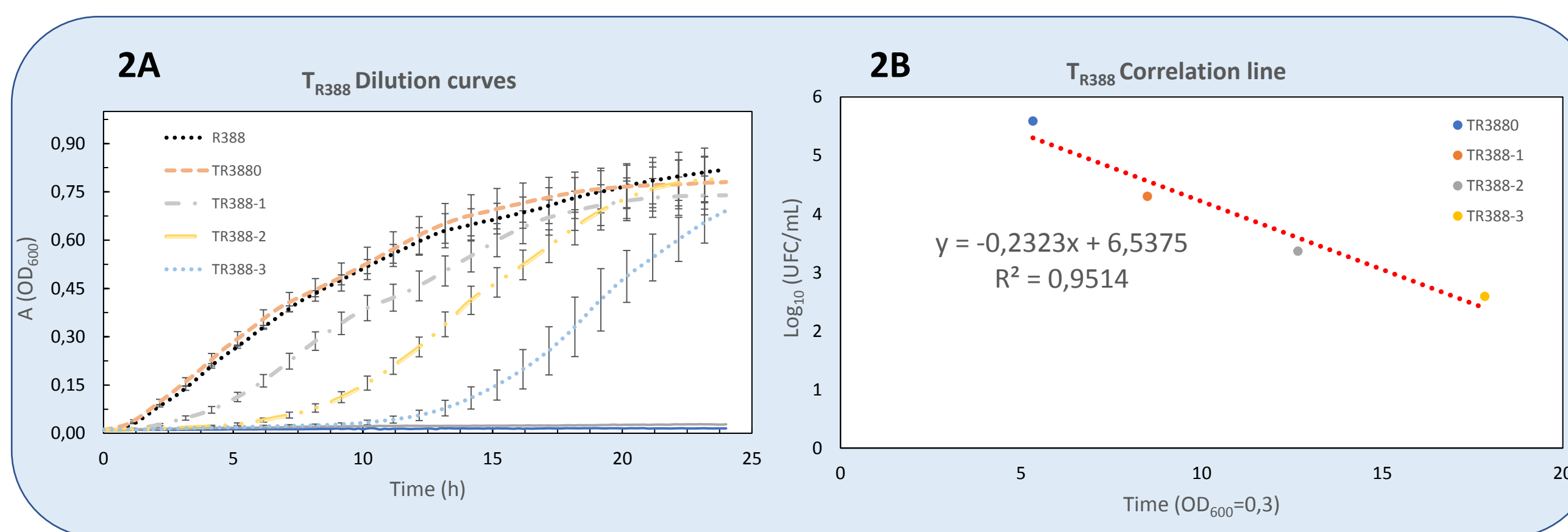
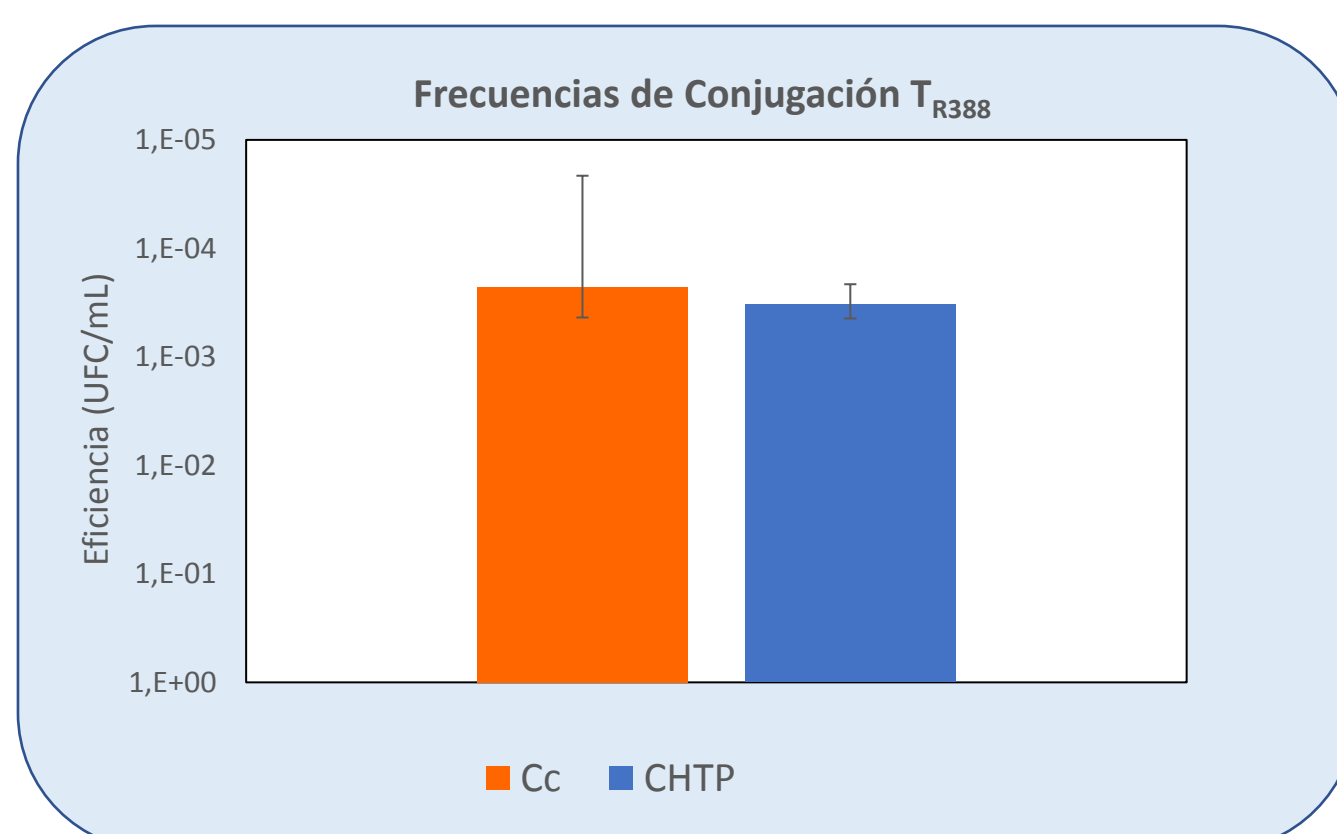


Figura 2. Recta de calibrado para el transconjugante (T_{R388}). **(2A)** Curvas de crecimiento de las diferentes diluciones del transconjugante. Después de la conjugación bacteriana, se realizaron diluciones seriadas del receptor en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos y los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C. Las curvas de crecimiento se obtuvieron registrando los valores de OD₆₀₀ cada 10 min. Para cada dilución se realizaron tres réplicas técnicas. Las barras de error (desviación estándar entre réplicas técnicas) se muestran cada hora. **(2B)** Relación entre Log₁₀ (UFC/mL) y el tiempo al que cada dilución alcanza OD₆₀₀ 0,3 (tOD₆₀₀) para el transconjugante. El tiempo se obtuvo a partir de las curvas de crecimiento, mientras que el Log₁₀ (UFC/mL) se obtuvo después de sembrar 50 µL de cada dilución del ensayo clásico por triplicado.

Figura 3. Frecuencia de conjugación bacteriana del plásmido R388 medida mediante Cc y CHTP. Las diferencias observadas con los datos obtenidos entre los dos métodos no son significativas con un valor de p < 0,05.



CONCLUSIONES

La plataforma desarrollada permite determinar la frecuencia de conjugación de una manera sencilla y rápida

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rodríguez, I., Arana, L., Ugarte-Urbe, B., Gómez-Rubio, E., Martín-Santamaría, S., Garbisu, C., & Alkorta, I. (2020). Type IV coupling proteins as potential targets to control the dissemination of antibiotic resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 201.

Campbell, J. L., Richardson, C. C., & Studier, F. W. (1978). Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(5), 2276-2280.

Epelde, L., Jauregi, L., Urra, J., Ibarretxe, L., Romo, J., Goikoetxea, I., & Garbisu, C. (2018). Characterization of composted organic amendments for agricultural use. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 44.

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., & Wool, E. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*.

O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*.