



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Diversidad de Beta-lactamasas de espectro extendido y de líneas genéticas en aislados de <i>Escherichia coli</i> de diferentes ecosistemas en La Rioja</b>
Autor/es
<b>Sergio Somalo San Rodrigo</b>
Director/es
Carmen Torres Manrique
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico



**Diversidad de Beta-lactamasas de espectro extendido y de líneas genéticas en aislados de *Escherichia coli* de diferentes ecosistemas en La Rioja**, tesis doctoral de Sergio Somalo San Rodrigo, dirigida por Carmen Torres Manrique (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor  
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014  
publicaciones.unirioja.es  
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Diversidad de beta-lactamasas de espectro extendido  
y de líneas genéticas en aislados de *Escherichia coli*  
de diferentes ecosistemas en La Rioja



Sergio Somalo San Rodrigo

Tesis Doctoral, Logroño 2013



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA  
Departamento de Agricultura y Alimentación  
Área de Bioquímica y Biología Molecular





UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Diversidad de beta-lactamasas de  
espectro extendido y de líneas genéticas  
en aislados de *Escherichia coli* de  
diferentes ecosistemas en La Rioja**

SERGIO SOMALO SAN RODRIGO

Tesis Doctoral

Logroño, 2013





UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

**Diversidad de beta-lactamasas de  
espectro extendido y de líneas genéticas  
en aislados de *Escherichia coli* de  
diferentes ecosistemas en La Rioja**

Memoria presentada por **SERGIO SOMALO SAN RODRIGO** para optar al título de Doctor  
por la Universidad de La Rioja.





Dra. **CARMEN TORRES MANRIQUE**, Catedrática del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja.

Por la presente manifiesta que,

La memoria titulada “**Diversidad de beta-lactamasas de espectro extendido y de líneas genéticas en aislados de *Escherichia coli* de diferentes ecosistemas en La Rioja**”, que presenta D. SERGIO SOMALO SAN RODRIGO, Licenciado en Biología, ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor,

Lo que hace constar en Logroño, a 24 de julio de 2013.

Fdo.: Carmen Torres Manrique



--Donde no falta voluntad, siempre hay un camino, decimos nosotros --susurró--,  
y yo mismo he podido comprobarlo.

Derhelm en el campamento del valle Sagrado

**El Señor de los Anillos, El Retorno del Rey**

*J.R.R Tolkien*

*"Si tienes la mente vacía siempre está preparada para cualquier cosa, abierta a todo."*

*— Shunryu Suzuki*

*"Cada uno es hijo de sus obras"*

*—Miguel de Cervantes Saavedra*



## Agradecimientos



Mis andanzas por la tesis



# ÍNDICE



## Tabla de contenido

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> , BACTERIA UBICUA .....	3
1.2 MECANISMOS DE MEJORA DEL ACERBO GENÉTICO .....	4
1.2.1 <i>Ecotipos, variantes dentro de las especies</i> .....	6
1.2.2 <i>Complejos clonales, ¿una forma de definir ecotipos?</i> .....	7
1.3 FITNESS, EL COSTE BIOLÓGICO DE LA VIDA .....	8
1.3.1 <i>Presión selectiva, la fuerza de la selección</i> .....	9
1.4 ANTIBIÓTICOS, UN TIPO DE PRESIÓN SELECTIVA .....	10
1.4.1 <i>Sulfamidas y Trimetoprim</i> .....	12
1.4.2 <i>Quinolonas y Fluoroquinolonas</i> .....	12
1.4.3 <i>Tetraciclinas</i> .....	13
1.4.4 <i>Aminoglucósidos</i> .....	13
1.4.5 <i>Fenicoles y cloranfenicol</i> .....	14
1.4.6 <i>Beta-lactámicos</i> .....	14
1.5 RESISTOMA, EL ALMACÉN DE LOS GENES DE RESISTENCIA.....	16
1.5.1 <i>Resistoma y mecanismos de resistencia</i> .....	18
1.5.2 <i>Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), un arma poderosa</i> .....	20
1.5.2.1 Origen de las BLEE y mecanismo de Acción.....	21
1.5.2.2 Origen de la familia CTX-M.....	21
1.5.2.3 Clasificación de las BLEEs.....	22
1.5.2.4 Evolución de las CTX-M y dispersión.....	24
1.5.3 <i>Sistemas de dispersión, la movilidad del resistoma</i> .....	24
1.5.3.1 Elementos de Inserción y Transposones.....	25
1.5.3.2 Integrones .....	28
1.5.3.3 Plásmidos .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 CEPAS CLÍNICAS DE <i>E. COLI</i> .....	39
3.2 MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS Y ENFERMAS Y DE ANIMALES.....	39
3.3 MUESTRAS DE ALIEMENTOS.....	39

## Índice

3.4	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS Y DE LAS MUESTRAS FECALES .....	40
3.5	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE .....	41
3.6	ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....	42
3.6.1	<i>Detección de Fenotipo BLEE</i> .....	42
3.6.2	<i>Difusión en agar</i> .....	43
3.7	EXTRACCIÓN DE ADN .....	44
3.8	REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR) .....	44
3.8.1	<i>caracterización de integrones y de sus regiones variables</i> .....	53
3.8.2	<i>Sistema PCR Walking-primer</i> .....	54
3.9	ESTUDIO DEL PERFIL PLASMÍDICO .....	55
3.10	GELES DE AGAROSA .....	56
3.11	SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES OBTENIDOS MEDIANTE PCR .....	57
3.12	PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR .....	58
3.13	ANÁLISIS DE SECUENCIAS .....	58
3.14	ESTUDIO DE RELACIÓN CLONAL .....	59
3.14.1	<i>Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)</i> .....	59
3.14.2	<i>Grupo Filogenético</i> .....	62
3.14.3	<i>Multi Locus Sequencie Typing (MLST)</i> .....	63
3.15	ANÁLISIS DE GELES DE CAMPOS DE PULSOS (PFGE) .....	64
3.16	ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MLST .....	65
3.17	CREACIÓN Y ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE MLST .....	66
3.18	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS .....	66
3.18.1	<i>Población/muestra</i> .....	67
3.18.2	<i>Diseño y Variables</i> .....	68
3.18.3	<i>Pruebas estadísticas</i> .....	68
3.18.3.1	Normalidad .....	68
3.18.3.2	Independencia .....	69
3.18.3.3	Comparación de Varianzas .....	69
3.18.4	<i>Contraste de Hipótesis</i> .....	69
3.18.4.1	Comparación de Poblaciones .....	70
3.19	MEDIO DE CONSERVACIÓN .....	70
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>73</b>
4.1	CEPAS DE <i>E. COLI</i> BLEE POSITIVAS (BLEE <sup>+</sup> ) OBTENIDAS DE ORIGEN HUMANO .....	73
4.1.1	<i>Aislados Clínicos</i> .....	73
4.1.1.1	Origen de las cepas BLEE <sup>+</sup> .....	73
4.1.1.2	Resistencia a los antibióticos .....	74
4.1.1.3	Variantes de BLEEs Y entornos GENETICOS .....	75
4.1.1.4	Grupos Filogenéticos .....	78

4.1.2	<i>Aislados de muestras fecales de personas sanas y de pacientes</i> .....	80
4.1.2.1	Variantes de BLEEs y Entornos genéticos .....	82
4.1.2.2	Fenotipo y genotipo de resistencia frente a antibióticos .....	82
4.1.2.3	Tipado molecular .....	83
4.1.2.4	Perfil Plasmídico.....	84
4.2	CEPAS DE <i>E. COLI</i> BLEE <sup>+</sup> OBTENIDAS EN ANIMALES .....	84
4.2.1	<i>Prevalencia de las cepas de E. coli BLEE<sup>+</sup></i> .....	84
4.2.2	<i>Variantes de Beta-lactamasas y Entornos</i> .....	87
4.2.3	<i>Fenotipo y genotipo de resistencia frente a antibióticos</i> .....	88
4.2.4	<i>Tipado molecular</i> .....	89
4.2.5	<i>Perfil Plasmídico</i> .....	89
4.3	CEPAS OBTENIDAS EN ALIMENTOS.....	90
4.3.1	<i>Prevalencia de la cepas E. coli BLEE<sup>+</sup></i> .....	90
4.3.2	<i>Variantes de BLEEs y entornos</i> .....	94
4.3.3	<i>Fenotipo y genotipo de resistencia frente a antibióticos</i> .....	96
4.3.4	<i>Perfil Plasmídico</i> .....	97
4.4	TIPADO MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE DIFERENTES ORÍGENES. ....	97
4.4.1	<i>Grupos filogenéticos</i> .....	97
4.4.2	<i>secuencias Tipo</i> .....	99
4.4.2.1	Secuencias Tipo y Origen.....	102
4.4.2.2	Secuencias Tipo y Grupos Filogenéticos .....	103
4.4.2.3	Secuencias Tipo y variante BLEE .....	104
4.4.3	<i>Árbol filogenético de las Secuencias Tipo</i> .....	105
4.4.4	<i>Comparación de patrones de PFGE</i> .....	107
4.5	ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LAS CEPAS AISLADAS EN LOS DIFERENTES ORÍGENES.....	108
4.5.1	<i>Normalidad</i> .....	109
4.5.2	<i>Comparación de Varianzas u homogeneidad</i> .....	109
4.5.3	<i>Contraste de Hipótesis</i> .....	110
4.5.4	<i>Comparación entre poblaciones</i> .....	111
5	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>115</b>
6	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>135</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>139</b>







## ABREVIATURAS

---

<b>3'-CS</b>	Extremo conservado 3'
<b>5'-CS</b>	Extremo conservado 5'
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADN-pol</b>	ADN polimerasa
<b>AMC</b>	Amoxicilia-Ácido Clavulánico
<b>AMK</b>	Amikacina
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>ATM</b>	Aztreonam
<b><i>attC</i></b>	Lugar de recombinación de genes casete
<b><i>attI</i></b>	Lugar de integración de genes casete
<b>BHI-agar</b>	Brain Heart Infusion agar
<b>BLEE</b>	Beta-lactamasa de espectro extendido
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CGs</b>	Casetes génicos
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CLO</b>	Cloranfenicol
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>CTX<sup>R</sup></b>	Resistente a Cefotaxima
<b>DHD</b>	Dosis por 1000 habitantes y por día
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato reductasa
<b>DR</b>	Direct repeat, Secuencia repetida directa
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECDC</b>	Centro europeo de control de enfermedades
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b><i>hfr</i></b>	high frequency of recombination; frecuencia alta de recombinación
<b>IMP</b>	Imipenem
<b>IRL</b>	Left Inverted Repeat, secuencia repetida invertida izquierda
<b>IRR</b>	Right Inverted Repeat, secuencia repetida invertida derecha
<b>IS</b>	Insertion Segment, Elemento de Inserción
<b>ISCR</b>	Región común con elementos de inserción. Un tipo de elemento móvil
<b>Kb</b>	Kilo pares de bases
<b>KAN</b>	Kanamicina
<b>MH-agar</b>	Muller-Hinton agar
<b>MLST</b>	Multi Locus Sequence Typing; Tipado de secuencias múltiples de loci
<b>m/v</b>	Relación entre masa y volumen
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NAL</b>	Ácido nalidixico
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PBPs</b>	Peniciline binding proteins, proteínas de unión a la penicilina
<b>P2</b>	Promotor de expresión de genes casetes externo a la integrasa
<b>PABA</b>	Ácido para-aminobenzoico
<b><i>P<sub>intI</sub></i></b>	Promotor de expresión de la integrasa
<b>Pc</b>	Promotor de expresión de genes casetes

## Abreviaturas

<b>PcH</b>	Variante híbrida del promotor de expresión de genes casetes
<b>PcS</b>	Variante fuerte del promotor de expresión de genes casetes
<b>PcW</b>	Variante débil del promotor de expresión de genes casetes
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction: reacción en cadena de la Polimerasa
<b>PFGE</b>	Pulse Field Gel Electrophoresis, Gel de electroforesis de campos pulsados
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SCC</b>	Complejo clonal de Secuencia Tipo
<b>ST</b>	Secuencia Tipo
<b>STR</b>	Estreptomina
<b>SUL</b>	Sulfamidas
<b>SXT</b>	Trimetoprim-sulfametoxazol
<b>TBE</b>	Tris Boro EDTA
<b>TET</b>	Tetraciclina
<b>Tn</b>	Transposón
<b>TOB</b>	Tobramicina
<b>TSI</b>	Triple Sugar Iron
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

## LISTADO DE TABLAS

---

- Tabla 1** Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (Suárez and Guidol 2009)
- Tabla 2** Genes más comunes identificados que se consideran resistoma extrínseco de *E. coli*
- Tabla 3** Origen de los diferentes genes que definen los grupos de CTX-M
- Tabla 4** Agrupación de las dos clasificaciones de BLEEs (Drawz and Bonomo, 2010)
- Tabla 5** Antibióticos utilizados y puntos de corte (CLSI, 2012)
- Tabla 6** Reactivos necesarios para realizar la PCR y concentraciones utilizadas
- Tabla 7** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a beta-lactámicos
- Tabla 8** Cebadores utilizados para determinar los entornos de los genes codificantes de BLEEs y sus entornos genéticos
- Tabla 9** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a quinolonas
- Tabla 10** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a tetraciclinas
- Tabla 11** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a cloranfenicol
- Tabla 12** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a sulfonamidas
- Tabla 13** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a los aminoglucósidos
- Tabla 14** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a trimetoprim
- Tabla 15** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con integrasas y para el estudio de las regiones variables de los integrones
- Tabla 16** Reactivos y condiciones de PCR para realizar la técnica de estudio de plásmidos PBRT (Carattoli *et al.*, 2005a)
- Tabla 17** Cebadores utilizados en PBRT para el estudio de plásmidos y condiciones de amplificación (Carattoli *et al.*, 2005a)
- Tabla 18** Cebadores necesarios para la identificación de los grupos filogenéticos
- Tabla 19** Cebadores y condiciones necesarias para realizar la amplificación de los 7 genes del tipado por MLST de las cepas de *E. coli*
- Tabla 20** Servicios del Hospital San Pedro en los que se encontraban los pacientes hospitalizados con aislamiento *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.
- Tabla 21** Tipo de muestra a partir de las cuales se aislaron las 72 cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>

## Listado de Tablas

**Tabla 22** Variantes de BLEEs detectadas en las cepas clínicas de *E. coli*

**Tabla 23** Asociación de BLEEs con otras beta-lactamasas en las 72 cepas clínicas BLEE<sup>+</sup> del estudio

**Tabla 24** Grupos filogenéticos de las cepas clínicas en función del tipo de enzima BLEE

**Tabla 25** Caracterización de BLEEs, entornos, genes de resistencia y estudio de integrones en los aislados de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de muestras fecales de pacientes y de personas sanas.

**Tabla 26** Caracterización de beta-lactamasas y tipado molecular de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> obtenidas de muestras fecales de perros sanos

**Tabla 27** Fenotipo y genotipo de resistencia y contenido plasmídico de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de muestras fecales de perros sanos

**Tabla 28** Muestras de alimentos estudiadas y su contenido en *E. coli* y en *E. coli* BLEE<sup>+</sup>

**Tabla 29** Tabla resumen de los datos de caracterización fenotípica y genotípica de las 40 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de alimentos (todas de origen aviar excepto una de origen porcino)

**Tabla 30** Beta-lactamasas identificadas en las 360 muestras de alimento de los dos periodos analizados

**Tabla 31** Porcentaje de resistencia y presencia de determinantes de resistencia a los antibióticos en los aislados *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de alimentos.

**Tabla 32** Tipos de organizaciones de genes casetes detectados en las regiones variables de los integrones de clase 1 y 2 en las cepas de *E. coli* de alimentos

**Tabla 33** Resultados significativos de las diferentes pruebas estadísticas realizadas ( $p < 0,05$ )

## LISTADO DE FIGURAS

---

**Figura 1** Esquema de secuencias tipo que relaciona STs y SCC de cepas portadoras de BLEE con entornos (Guenther *et al.*, 2011).

**Figura 2** Un asca fotografiada mediante microscopía electrónica y coloreada por ordenador. Se pueden observar las esporas al final de las ascas.

**Figura 3** Estructuras moleculares de sulfamidas y trimetoprim.

**Figura 4** Estructura de las fluoroquinolonas. Si no está presente un átomo de flúor en la posición 6, representa el esquema de las quinolonas.

**Figura 5** Esquema general de las tetraciclinas.

**Figura 6** Estructura de la Gentamicina.

**Figura 7** Estructura del cloranfenicol.

**Figura 8** Esquema de una bacteria, del resistoma intrínseco y de las condiciones externas. Se puede ver que el resistoma intrínseco se relaciona con los determinantes clásicos cromosómicos y que puede ser modificado tanto por el ambiente como por genes circulantes (Esquema adaptado de Olivares Pacheco *et al.*, 2013).

**Figura 9** Prevalencia de cepas invasivas de *E. coli* resistentes a cefotaxima en países de la Unión Europea.

**Figura 10** Mecanismo de acción de las Beta-lactamasas .

**Figura 11** Esquema general de una Secuencia de Inserción (Mahillon and Chandler, 1998).

**Figura 12** Esquema de un transposón y comparación con una IS. (Adaptada de deToro, 2013).

**Figura 13** Comparación de estructuras entre IS e ISCR. (Adaptada de deToro, 2013).

**Figura 14** Modelo de incorporación y escisión de casetes génicos de la estructura del integrón (deToro, 2013).

**Figura 15** Organización modular de un plásmido conjugativo (R388) y uno movilizable (RSF1010) (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

**Figura 16** Imagen de las pruebas bioquímicas. A la izquierda se presentan los medios previa inoculación y a la derecha se presenta una batería de pruebas positivas y negativas.

**Figura 17** Prueba de doble disco modificada para la detección de fenotipo BLEE.

**Figura 18** Porcentaje de resistencia a antibióticos en las cepas clínicas BLEE<sup>+</sup> del Hospital San Pedro.

**Figura 19** Distribución de aislados en función del número de familias de antibióticos a las que presentaron resistencia.

**Figura 20** BLEEs identificadas en las cepas clínicas de *E. coli* en función del año de aislamiento.

**Figura 21** Entornos genéticos detectados en los genes *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M,15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-67</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> en las cepas clínicas de *E. coli*.

**Figura 22** Distribución de las cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en función de su grupo filogenético.

**Figura 23** Distribución de las cepas clínicas en función del tipo de BLEE y grupo filogenético.

## Listado de Figuras

**Figura 24** Entornos de los genes codificantes de BLEEs identificados en los aislados fecales de *E. coli* de pacientes y personas sanas.

**Figura 25** Entornos de genes de BLEEs detectados en las cepas aisladas de perros.

**Figura 26** Número de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de origen canino que presentan resistencias a los diferentes antibióticos testados.

**Figura 27** Entornos de los genes codificantes de BLEEs detectados en las cepas de *E. coli* de alimentos.

**Figura 28** Distribución de los grupos filogenéticos entre el total de las cepas.

**Figura 29** Grupos filogenéticos detectados en las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en función del origen de las mismas.

**Figura 30** Relación de todos los STs obtenidos en las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes. El esquema superior (Full goeBURST) presenta las relaciones totales entre STs, diferenciando nodos como principales, secundarios y nodos nexa (se asocian los ST que presentan hasta 6 alelos diferentes). El esquema inferior (goeBURST 3 niveles) define las relaciones hasta tres niveles, une los STs que son más similares, dejando a los diferentes fuera de los grupos y asignándoles temporalmente una condición de nodo primario (se asocian los ST que presentan hasta 3 alelos diferentes).

**Figura 31** Esquema Full goeBURST que relaciona los STs obtenidos en función del origen de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.

**Figura 32** Esquema Full goeBURST que presenta la relación entre Secuencias Tipo y Grupos filogenéticos.

**Figura 33** Esquema Full goeBURST que presenta la relación entre BLEEs y Secuencias Tipo.

**Figura 34** Árbol filogenético generado con las secuencias de los 7 alelos de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> utilizados para el tipado molecular por MLST.

**Figura 35** Dendrograma generado por comparación de los patrones de PFGE-Smal de las 72 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de diferentes orígenes (personas sanas y pacientes, perros y alimentos).

## RESUMEN

---

Las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) suponen un mecanismo de resistencia de gran relevancia clínica ya que afecta a beta-lactámicos de gran utilidad en terapéutica humana, como son las cefalosporinas de amplio espectro. Asimismo, *Escherichia coli* es un microorganismo ubicuo, que forma parte de la microbiota intestinal de animales y de personas sanas y al mismo tiempo es un importante patógeno oportunista. En los últimos años se ha descrito la diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs en diferentes nichos ecológicos. El objetivo de esta tesis fue el determinar las variantes de BLEEs en cepas de *E. coli* de diferentes orígenes (personas, sanas y enfermas, animales y alimentos) obtenidas en La Rioja y determinar las líneas genéticas de estos microorganismos circulantes y su contenido en genes de resistencia y en determinantes plasmídicos.

Se caracterizaron en primer lugar 98 cepas clínicas de *E. coli* resistentes a cefotaxima (CTX<sup>R</sup>) obtenidas durante 2004-2007 en el Hospital San Pedro de Logroño y 72 de ellas fueron productoras de BLEEs (73 %). La mayor parte de las cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> correspondían a aislados de la comunidad (67 %) y fundamentalmente de origen urinario (75%). Las variantes de BLEEs mayoritarias en las cepas clínicas de *E. coli* fueron CTX-M-14 (65 %), seguida de SHV-12 (15 %) y CTX-M-9 (12 %). A partir de 2006 se comenzó a detectar el clon CTX-M-15-B2-ST131. Los grupos filogenéticos mayoritarios en estas cepas fueron el A, B2 y D.

A continuación se analizó la frecuencia de detección de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en muestras fecales de pacientes (n=99) y de personas sanas (n=115), detectándose estos microorganismos resistentes en el 7 % y 4 %, respectivamente, de las muestras analizadas. Las variantes de BLEEs identificadas fueron SHV-12, CTX-M-14 y CTX-M-15. Se detectó cepas del clon CTX-M-15-B2-ST131 en heces de dos personas sanas no relacionadas, las cuales presentaron el mismo patrón de PFGE. Se analizó asimismo muestras fecales de 126 perros de la perrera municipal de la Rioja, detectándose *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en el 16 % de las mismas. Las variantes de BLEEs más frecuentemente detectadas fueron SHV-12 (40 %), CTX-M-14 (35 %, variantes a y b), y en menor frecuencia CTX-M-1 (15 %) y CTX-M-32 (10 %).

Se analizaron asimismo 360 muestras de alimentos de origen cárnico, obtenidas en supermercados y carnicerías de la Rioja en los periodos 2007-2009 y 2011, detectándose *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en el 25 % de las muestras derivadas del pollo y en <1 % de las derivadas de cerdo. Se evidenció un incremento en la frecuencia de detección de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en las muestras de pollo de 2011 (50 %) respecto a las de 2007-2009 (21,5%). Se detectó de manera mayoritaria las variantes CTX-M-14 y SHV-12 (75 %) y de forma minoritaria otras variantes (CTX-M-9, CTX-M-1, CTX-M-32 y TEM-52) (25%).

Se demostró la presencia de integrones en el 53 % de las 72 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de muestras fecales de personas y de animales o de alimentos, siendo los más frecuentes los integrones de clase 1 (con 5 regiones variables diferentes) y dentro de éstos se pudieron identificar tanto integrones clásicos como defectivos. Se detectaron integrones de clase 2 en el 7% de las cepas BLEE<sup>+</sup> con dos tipos de regiones variables.

Se analizó la diversidad clonal de las cepas BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes por las técnicas de PFGE y MLST detectándose una gran diversidad clonal (39 secuencias tipo (ST) diferentes entre las 72 cepas analizadas y 70 patrones de PFGE en dichas cepas). El 23 % de los STs detectados fueron identificados en más de un ecosistema analizado y las STs mayoritarios fueron ST10, ST359, ST57, ST665, ST224 ST117, ST131 y ST23. Los aislados se agruparon en 4 complejos clonales principales (SCC10, SCC23, SCC224 y SCC359) y 4 singletones, siendo ST131 uno de ellos. Se determinó el grupo filogenético de las cepas de los diferentes orígenes: las cepas de origen clínico fueron mayoritariamente de los grupos filogenéticos A, B2 y D y las comensales de personas, animales y alimentos de los grupos filogenéticos A y B1.

Se estudió el contenido en replicones de plásmidos y en genes de resistencia de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes observándose una gran variedad tanto de genes de resistencia como de replicones en las mismas. Se evidenciaron diversas asociaciones con significación estadística como presencia de CTX-M-1-filogrupo D-replicón IncI1, CTX-M-15-grupo filogenético B2-resistencia a aminoglucósidos ó CTX-M-9-integrones tipo-1.

“Es muy peligroso, Frodo, cruzar la puerta” solía decirme. “Vas hacia el camino, y si no cuidas tus pasos no sabes hacia dónde te arrastrarán...”

--Frodo, citando a Bilbo.

## **El Señor de los Anillos, La Comunidad del Anillo**

*J.R.R Tolkien*

# INTRODUCCIÓN

*“La naturaleza benigna provee de manera que  
en cualquier parte halles algo que aprender.”*

*--Leonardo da Vinci*



# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 *ESCHERICHIA COLI*, BACTERIA UBICUA

Según el Manual de Bergey de Determinación Bacteriológica, *Escherichia coli* se clasifica del siguiente modo:

El Dominio ***Bacteria*** es el grupo que engloba a todas las bacterias conocidas, dentro de él, existen tres subdominios, de los cuales ***Eubacteria*** es el que nos interesa. El Filo ***Proteobacteria*** es uno de los filos que podemos encontrar y que engloba cinco Clases ***Alfaproteobacteria***, ***Betaproteobacteria***, ***Gammaproteobacteria***, ***Deltaproteobacteria*** y ***Epsilonproteobacteria***. La Clase ***Gammaproteobacteria*** se divide en varios órdenes, siendo el Orden ***Enterobacteriales*** el que contiene la Familia ***Enterobacteriaceae***. Esta es la Familia a la que pertenece el género *Escherichia*. Este género se subdivide en siete especies y una de ellas es *Escherichia coli* (*E.coli*) (Clermont *et al.*, 2011).

La especie *E. coli* se caracteriza por ser bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, fermentador de lactosa, indol positivo y citrato negativo. Es una especie que presenta bacterias con una capacidad de adaptación a diferentes nichos ecológicos muy grande y así podemos aislar *E. coli* de muy diversos ambientes como agua, suelo, lodos o en los sistemas digestivos de distintos animales y de los seres humanos. Todos estos nichos son diferentes y con particularidades, de forma que la presencia de estas bacterias indica su alta capacidad adaptativa y una plasticidad génica importante.

El fin último de toda especie es su perpetuación y esta finalidad da como resultado la aparición de estrategias que ayuden a completarla. Además hay que observar que la presencia de estas bacterias en cualquier ambiente no es aislada, no son las únicas, sino que coexisten con otras muchas especies diferentes (Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2012) y todas con la misma finalidad: perpetuarse. Eso genera lo que conocemos como Ecosistemas, estructuras más o menos jerarquizadas localizadas en espacios físicos que presentan determinadas características. El hecho de que existan varios seres vivos en un mismo espacio físico implica relaciones entre ellos. Todos los seres vivos heterótrofos, es decir, seres incapaces de crear sus propios nutrientes, requieren de nutrientes externos para sobrevivir y un ecosistema tiene una cantidad limitada de dichos nutrientes, lo que obliga a las diferentes especies a **interaccionar entre ellos** de

forma que puedan acceder a esos nutrientes y la forma en la que se da esa interacción puede ser variada (Venturi and Silva, 2012; Fischbach and Sonnenburg, 2011).

### 1.2 MECANISMOS DE MEJORA DEL ACERBO GENÉTICO

Se ha comentado anteriormente, *E. coli* se puede aislar a partir de muchos ecosistemas diferentes. Esta bacteria puede vivir en muchos lugares con otras especies y mantenerse en ellos, unas veces aprovechando los cambios ambientales, otras veces especializándose, otras actuando directamente contra competidores con herramientas como las colicinas, un tipo de bacteriocinas, o indirectamente, por ejemplo acidificando el entorno, pero siempre buscando la adaptación. Pero al final, todas las herramientas que tiene la bacteria para hacer frente al medio están codificadas en el ADN y la forma de evolucionar y poder adaptarse pasa por adquirir nuevos cambios en el ADN.

Los seres eucariotas pluricelulares presentan una herramienta formidable para obtener nuevos cambios en el ADN que aumenten las posibilidades de adaptación y es la reproducción sexual, un proceso en el que se da una mezcla y renovación genética importante, pero esta actividad no es viable dentro del Reino Bacteria.

Pero que no exista reproducción sexual no implica que no se den mecanismos de renovación genética entre bacterias. El primer mecanismo es la **Mutación**, cambios en el ADN generados durante el proceso de división celular o inducidos por agentes externos. La enzima encargada de copiar el ADN, la ADN polimerasa (ADN-pol), no es ni mucho menos tan fiable como pueda ser una polimerasa eucariota, y errores de un nucleótido en una posición crítica bien puede implicar la muerte de esa bacteria, pero también puede dar lugar a una ventaja adaptativa eficiente o una ventaja adaptativa dormida esperando que las condiciones ambientales cambien. Además hay otros mecanismos como el de reparación de errores o duplicación de genes y que pueden ayudar en los procesos evolutivos (Maharjan *et al.*, 2013).

La existencia de presiones pueden llegar a salvarse forzando un fenotipo hipermutador, de forma que se la bacteria aumente su tasa de mutación para así intentar obtener algún gen que le aumente las posibilidades de sobrevivir en ese ambiente.

Una forma es de llegar a esa situación se dándose una mutación en mutL que forma parte del sistema MMR (mismatch repair system, sistema de reparación de emparejamientos erróneos) y así obtener un fenotipo hipermutador estable (Becket *et*

*al.*, 2012), mientras que otra forma de obtener un fenotipo hipermutador es mediante la activación de las ADN-pol II, IV y V. Estas ADN-pol se activan cuando el sistema SOS se activa (Sutton *et al.*, 2000). Este fenotipo hipermutador se define como puntual, ya que en el momento que el sistema SOS se inhibe, desaparece la capacidad mutadora.

Pero además de estas acciones internas, existen otras opciones y es la adquisición de genes exógenos mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos consiste en adquirir la capacidad para detectar e introducir ADN que se encuentra en el medio ambiente, en el interior de la bacteria. Este proceso se denomina **Transformación** (Kelly *et al.*, 2009) y con ello, la bacteria, si consigue mantener estable ese ADN exógeno en su interior, puede llegar a interiorizar y asimilar genes foráneos, bien sea por recombinación homóloga con el cromosoma o con otros elementos genéticos que pueda presentar. Mucho de este ADN exógeno no se mantiene estable en el citoplasma bacteriano ya que es atacado por las endonucleasas al detectar un patrón de metilación diferente al propio, es un mecanismo de seguridad frente a fagos pero que limita bastante la regeneración génica. Otro mecanismo es la **Transducción** (Kelly *et al.*, 2009), fenómeno de intercambio de ADN entre bacterias del mismo género o especie mediado por fagos bacterianos. En este caso, un fago, un virus bacteriófago, al empaquetarse dentro de su bacteria huésped, comete un error e introduce en la cápsida parte de ADN bacteriano, y aunque es una partícula vírica funcional, es decir que puede llegar a infectar a otra bacteria, el ADN que le inyecta a esta segunda bacteria no es vírico, sino bacteriano, con un patrón de metilación igual o equivalente y la bacteria transducida puede adquirir esos genes *de novo*. El tercer método es la **Conjugación** (Kelly *et al.*, 2009). En este método se puede considerar que es el método más parecido a una reproducción sexual y en él, dos bacterias se ponen en contacto físicamente a través de un conducto proteico denominado pili sexual, y la bacteria donadora transfiere material genético a su receptora. Generalmente esta capacidad viene codificada en elementos extracromosómicos denominados plásmidos F y las cepas que pueden donar elementos son llamadas cepas F<sup>+</sup>, mientras que las cepas receptoras son cepas F<sup>-</sup>. El hecho de recibir el elemento extracromosómico no siempre convierte a una cepa F<sup>-</sup> en F<sup>+</sup>.

Existe un tipo de bacterias *E. coli* que son capaces de recombinar su ADN con más frecuencia que el resto de cepas, éstas son reconocidas y definidas como cepas hfr (high frequency of recombination) y este tipo de cepas pueden incluir en su cromosoma

plásmidos. Cuando una bacteria *E. coli*-hfr con un plásmido F<sup>+</sup> inicia un proceso de conjugación, puede transferir parte de su cromosoma a la bacteria F<sup>-</sup>, en vez de un plásmido. De este modo se puede dar un intercambio mayor de genes entre bacterias (Winkler and Kao, 2012)

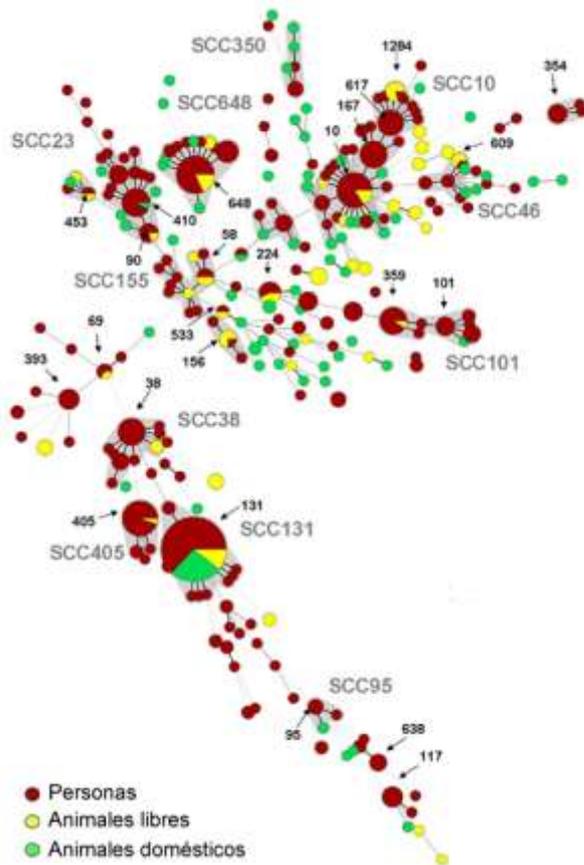
### 1.2.1 ECOTIPOS, VARIANTES DENTRO DE LAS ESPECIES

Con estas estrategias, las bacterias pueden generar un sinnúmero de variantes y modificaciones dentro de su genoma, puede adquirir nuevos elementos extracromosómicos o pueden modificar los que ya presentan y todo esto buscando la mejor adaptación posible al medio en el que se encuentren. De esta forma, una especie puede llegar a presentar grandes diferencias entre individuos localizados en ambientes bastante diferenciados. Estas diferencias génicas, siendo grandes pero no lo suficientemente como para considerar una nueva especie, se pueden definir como **ecotipos** (Cohan, 2001).

La existencia de ecotipos no rompe con la clasificación taxonómica de las bacterias, sino que ofrece una forma de definir grupos de bacterias adecuadas a ambientes. En una determinada área geográfica, como por ejemplo La Rioja, existen muy diversos ambientes ecológicos (hospitales, ganaderías, matadero, recursos naturales de ocio, agricultura...) cada uno con sus características propias (temperatura, humedad, nutrientes, sustrato, acidez...) que pueden marcar diferencias. Por ejemplo, el ambiente hospitalario es un ambiente altamente selectivo y con una disponibilidad de nutrientes muy baja mientras que una explotación agraria de aves presenta un lugar con una alta disponibilidad de nutrientes, alta temperatura, una acidez del sustrato medio-alta. En ambos lugares hay *E. coli*, pero es de esperar que presenten diferencias metabólicas unas de otras y puede ser que esas diferencias sean grandes, de este modo podemos entender que podría haber dos ecotipos, uno de ambiente hospitalario y otro de ambiente de explotación aviar. Pero también se pueden dar estas diferencias en las bacterias que se localizan dentro de los sistemas digestivos de los diferentes animales. *E. coli* es una bacteria con una temperatura idónea de vida en el rango 36° C y 38° C, temperatura corporal del ser humano, pero se encuentra también en el interior de los sistemas digestivos de aves, animales con una temperatura corporal que ronda los 43° C. Vivir constantemente a una temperatura alta, hace que la bacteria deba aclimatarse y autorregularse, es una diferencia importante que puede implicar cambios metabólicos.

### 1.2.2 COMPLEJOS CLONALES, ¿UNA FORMA DE DEFINIR ECOTIPOS?

Si bien el concepto de ecotipo implica una especialización de una población en un ecosistema y esta especialización se ve reflejada en cambios del ADN, es posible intentar rastrear estos cambios, a modo de reloj evolutivo, para poder determinar la



**Figura 1** Esquema de secuencias tipo que relaciona STs y SCC de cepas portadoras de BLEE con entornos (Guenther *et al.*, 2011).

relación entre las líneas genéticas circulantes según las técnicas moleculares y los ecotipos definidos según los ecosistemas donde se desarrollan las poblaciones.

Actualmente se está aplicando una metodología de clasificación de líneas genéticas basada en el estudio de unos genes integrados en el cromosoma y considerados como esenciales para la vida de la bacteria, en inglés housekeeping. De este modo, mutaciones que los inutilicen provocan la eliminación de la cepa, de forma que solo quedan las mutaciones silentes o silenciosas y las mutaciones que favorecen o adaptativas. Esta técnica se denomina MLST o Multi Locus

Sequence Typing, traducido como Tipado de secuencias múltiples de loci, es aplicada a varias especies y en el caso de *E. coli* se han diseñado al menos dos técnicas diferentes, lo que cambia son los genes housekeeping elegidos y en este estudio hemos aplicado el sistema alemán que se basa en el estudio de una parte de la secuencia de los genes *adhk*, *fumC*, *icd*, *gyrB*, *mdh*, *purA* y *recA* (Wirth *et al.*, 2006). El estudio de los cambios de nucleótidos dentro de las secuencias define los diferentes alelos de cada locus, recibiendo un número y la combinación de estos números dan lugar a la Secuencia Tipo (ST), un número que etiqueta de forma inequívoca la bacteria estudiada.

Pues bien, de este modo se han identificado hasta la fecha más de 3000 STs y estos elementos, utilizando algoritmos de agrupación como el goeBURST (Francisco *et al.*, 2012) se pueden relacionar entre si generando grupos de STs, conocidos como

Complejos Clonales de Secuencias Tipo (SCC). Esta información puede ir acompañada de otros datos como tipo de genes de resistencia, origen de la cepa, origen de la muestra... y así poder realizar mapas conceptuales como el presentado en la figura 1.

### 1.3 FITNESS, EL COSTE BIOLÓGICO DE LA VIDA

El aclimatarse a medios que difieren del idóneo o adquirir nuevas mutaciones y nuevos genes puede dar lugar a un mayor gasto energético global de la bacteria, con lo que su tasa de crecimiento es menor y en condiciones donde esa mutación no le reporte una verdadera mejora frente al resto de competidores, implicará inevitablemente una menor tasa de crecimiento y con ello una pérdida de competitividad o disminución de **fitness** (Orr, 2009).

Este concepto este concepto significa la capacidad de un individuo para sobrevivir y perpetuarse. Es un concepto sencillo y de fácil comprensión pero que engloba una cantidad de aspectos muy grande y factores muy amplios. Todo ser vivo tiene su fitness y los cambios del ecosistema donde se encuentra y los cambios internos repercuten directamente en esta capacidad. En las bacterias, los sistemas que hemos presentado anteriormente para la renovación del ADN, son herramientas para mejorar su fitness, pero pueden perjudicarlo también.

Como se ha insinuado anteriormente, la adición de genes exógenos, generalmente provoca un cambio en el balance energético de la bacteria, que ha de suplirlo de algún modo, y normalmente lo hace disminuyendo la tasa de división, es decir, que la colonia que pueda generar o de la que forma parte, reduce su tasa de crecimiento. Si existe un estímulo externo que provoca un cambio de las condiciones del ecosistema, todos los seres vivos que se encuentran en ese ecosistema lo sufren. Estos estímulos son cambios de muy diversa índole que eliminan las condiciones de equilibrio previo en el ecosistema y todos los seres vivos reaccionan frente a ese estímulo intentando adaptarse con las herramientas que tienen a su disposición. Por ejemplo, en un ecosistema terrestre, unas tierras de labranza, llega una riada de lodo cargado con metales pesados (por ejemplo la rotura de la presa de Aznalcóllar en 1998). Esta presencia de metales es un estímulo que provoca un cambio en el equilibrio de ese terreno, y la vida sufre un estímulo en forma de presión ambiental por la presencia de metales pesados en altas concentraciones. Centrándonos en las bacterias, todos los ecotipos asentados en ese terreno sufrirán en igual intensidad este evento, de forma que

su tasa de crecimiento será cero si no presentan herramientas para contrarrestar la presencia de estos metales en el medio y en el interior del citoplasma. Si por cualquier situación, un grupo de bacterias ha desarrollado anteriormente una mutación o han adquirido de algún modo unos genes que confieren resistencia frente a estos metales, aunque anteriormente esos genes provocaron una disminución de su fitness, podrán hacer frente a la situación actual con más éxito que el resto de bacterias. Así pues en el nuevo ecosistema, éstas bacterias serán las que tengan mayor fitness y las que podrán acceder mejor y más rápidamente a los nutrientes (Andersson and Hughes, 2010).

### 1.3.1 PRESIÓN SELECTIVA, LA FUERZA DE LA SELECCIÓN

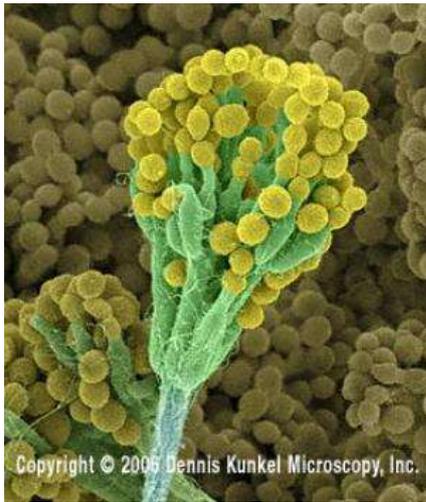
Las presiones ambientales provocan cambios en los ecosistemas de cara a los ecotipos que se encuentran en ellos y que fuerzan a las bacterias a buscar herramientas dentro de su genoma para sobrevivir, se conocen como **presiones selectivas** y si una presión selectiva es muy fuerte o se encuentra aplicada durante un periodo de tiempo largo, genera eventos de evolución llamados  **cuellos de botella**. Estos eventos son importantes a lo largo de la evolución de los seres vivos y también de las bacterias porque una presión selectiva fuerte puede provocar en las bacterias que la tasa de mutación y la tasa de conjugación aumenten en respuesta para poder obtener alguna ventaja adaptativa (Andersson and Hughes, 2010; Martinez, 2009). Los cuellos de botella son importantes conocerlos porque son eventos en los que una presión selectiva influye de forma decisiva en una especie, dando como resultado la fijación de ecotipos eficientes en un ecosistema concreto.

La disminución del fitness de un ecotipo puede lastrarlo y llevarlo a la extinción en ese ecosistema. Esta situación de estrés hace que los mecanismos adaptativos antes comentados se disparen y se generen más cambios de forma que el ecotipo busca compensar esa pérdida de fitness. De este modo se pueden dar mutaciones compensatorias, o la adquisición horizontal de genes que actúen de forma compensatoria.

Hasta el momento se ha hablado de pérdidas de competitividad ecológica a causa de mutaciones o de adquisición de genes exógenos, pero también hay casos donde estos eventos no implican una disminución de fitness (Andersson and Hughes, 2010; Björkman and Andersson, 2000).

## 1.4 ANTIBIÓTICOS, UN TIPO DE PRESIÓN SELECTIVA

Se sabe que en 1928 Alexander Fleming descubre accidentalmente la penicilina.



**Figura 2** Un asca fotografiada mediante microscopía electrónica y coloreada por ordenador. Se pueden observar las esporas al final de las ascas.

Se cuenta que en las placas de cultivo donde estaba trabajando con una serie de bacterias entre ellas *Staphylococcus aureus*, comenzó a crecer un moho que inhibía el crecimiento de dicho microorganismo. Se necesitaron varios años hasta que se supo qué era lo que estaba ocurriendo, qué principio activo era el que estaba actuando y cómo conseguirlo industrialmente para su uso en humanos.

Ese hongo era *Penicillium notatum*, una cepa de un **Ascomiceto** capaz de producir 2  $\mu\text{g}$  de principio activo por litro de cultivo. El género *Penicillium* se puede encontrar en una gran variedad de nichos, siendo el mayoritario los suelos. Otro

grupo de seres vivos, esta vez bacterias gram positivas pertenecientes al género *Streptomyces* y también típicas de suelos y humus, se vio que generaban un conjunto de metabolitos secundarios que actuaban contra otros seres vivos. Los metabolitos comentados son la **penicilina** y **estreptomomicina**, antibióticos de uso común en la actualidad y que se encuentran en el medio natural.

Un **antibiótico** es un **metabolito secundario** de bacterias y hongos que tiene la capacidad de interferir en la maquinaria de crecimiento de una célula viva y dañarla. Se considera un metabolito secundario porque es un producto que la bacteria u hongo no utiliza para funciones primarias (obtención de energía o ladrillo estructural) y suele ser expulsado al medio.

Estos compuestos pueden no encontrarse en concentraciones altas, pero sí están presentes y generan una presión selectiva en el ecosistema, de forma que toda bacteria que no pueda defenderse, morirá. Así pues, en ecosistemas como estos, la presencia de mutaciones que inicialmente generan una bajada en la fitness de la bacteria, pueden ser productores en cuanto a supervivencia, ya que aunque el crecimiento bacteriano sea lento, es competitivo frente a las bacterias que presenten sensibilidad a esos antibióticos. Un ejemplo es la mutación del gen *rpsL* en *E. coli*. La mutación de este gen

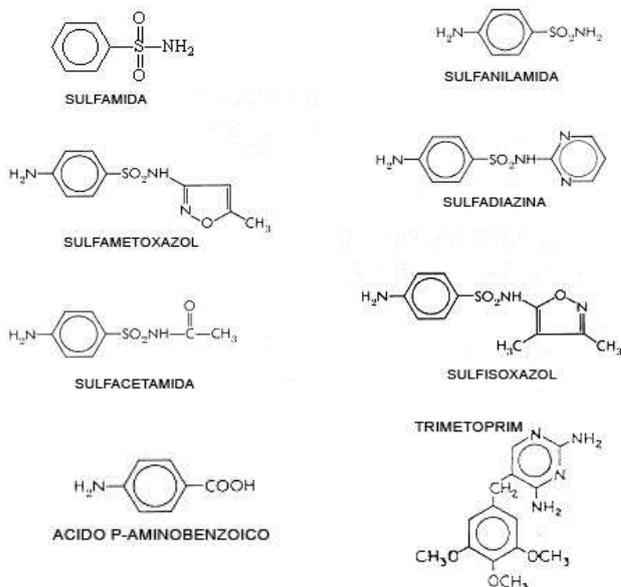
lastra bastante a la cepa en concepto de supervivencia, pero a su vez le confiere resistencia frente a la estreptomicina, de forma que en medios donde haya bacterias del género *Streptomyces* que secreten al medio estreptomicina. El fitness sigue baja pero sobreviven (Andersson and Hughes, 2010).

Este tipo de sustancias en la naturaleza han sido y están siendo utilizadas como armamento frente a otros seres vivos para asegurar el mantenimiento del ecotipo en un nicho y disminuir la competencia sobre los recursos existentes, pero el ser humano, una vez que ha comprendido qué son y cómo actúan, ha visto en ellos un filón para salvar vidas y mejorar la calidad de vida de pacientes y enfermos. Tras el descubrimiento de la penicilina y de su explotación industrial, las vidas salvadas en el primer conflicto mundial del siglo XX fueron muchas, pero también ese uso trajo consigo una respuesta: la resistencia.

Hay diferentes familias de antibióticos que se utilizan hoy día en el arsenal terapéutico tanto en medicina humana como en veterinaria con fines profilácticos o terapéuticos. Durante mucho tiempo también se han utilizado algunos antibióticos como promotores del crecimiento animal, aunque esta práctica está prohibida en la Unión Europea desde el 2006.

La industria farmacéutica ha desarrollado asimismo compuestos semisintéticos (derivados de los antibióticos naturales) o antimicrobianos sintéticos que se han incluido en el arsenal terapéutico, y algunas de estas familias de fármacos son las fluoroquinolonas, sulfamidas o trimetoprima, entre otros.

### 1.4.1 SULFAMIDAS Y TRIMETOPRIM



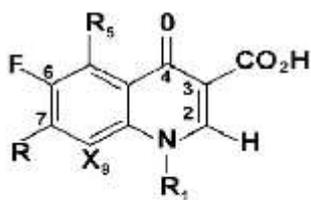
**Figura 3** Estructuras moleculares de sulfamidas y trimetoprim.

Son los primeros antibióticos sintéticos utilizados y se empezaron a emplear en los años treinta. Utilizan un sistema de inhibición competitiva con el ácido p-aminobenzoico (PABA), importante en la síntesis del ácido tetrahidrofólico, precursor de la timina y las purinas. El trimetoprim, comercializado en los sesenta del siglo XX, es una molécula sintética que tiene su diana en la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), que también actúa en la ruta del folato y ejerce una inhibición competitiva

(Sköld, 2001).

Ambos agentes son utilizados conjuntamente, y pueden detener completamente la ruta del folato ya que actúan en dos pasos consecutivos y la estructura homóloga que presentan estos antibióticos es un anillo benzénico con un radical amino en posición Para.

### 1.4.2 QUINOLONAS Y FLUOROQUINOLONAS



**Figura 4** Estructura de las fluoroquinolonas. Si no está presente un átomo de flúor en la posición 6, representa el esquema de las quinolonas.

Son otra familia de antibióticos sintéticos que descubrieron en 1962 con el ácido nalidíxico, la primera quinolona. Son unas moléculas con una estructura bicíclica hetero-aromática y con una zona común 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. Las primeras no llevaban flúor y eran de una actividad potente pero de espectro de acción reducido. La presencia de un átomo de flúor en posición 6, hace que pueda ser un antibiótico de mayor espectro y aplicación (Mella *et al.*, 2000).

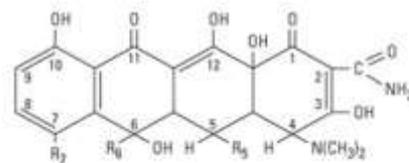
Quinolonas y fluoroquinolonas actúan sobre dos enzimas involucradas en la replicación y transcripción del ADN: la topoisomerasa II y la

topoisomerasa IV. La primera enzima es una ADN-girasa y la segunda se encarga de regular la topología del ADN. El mecanismo de acción es complejo, de forma que la quinolona interacciona con las enzimas y con el ADN generando un complejo estable que inutiliza a las enzimas para el proceso de replicación del ADN. La diana primaria en gram negativos es la topoisomerasa II y la diana primaria en gram positivos es la topoisomerasa IV (Fàbrega *et al.*, 2009), se ha visto que tanto la primera como la segunda tienen una secuencia homóloga que reconocen las quinolonas y fluoroquinolonas donde pueden actuar y así bloquear la maquinaria de replicación y transcripción, forzando de este modo la muerte celular.

Las familias de antibióticos de origen natural más utilizadas son: beta-lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y fenicoles.

### 1.4.3 TETRACICLINAS

Antibióticos de origen natural descubiertas como metabolitos secundarios de diferentes especies del género *Streptomyces*, son unas moléculas muy variadas y con diferentes mecanismos de acción. Son unas moléculas activas frente a una gran variedad de bacterias y presentan una baja toxicidad para eucariotas, eso ha hecho que sean utilizadas ampliamente



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Clortetraciclina	—Cl	—CH <sub>3</sub>	—H	—H	—H
Oxitetraciclina	—H	—CH <sub>3</sub>	—OH	—H	—H
Tetraciclina	—H	—CH <sub>3</sub>	—H	—H	—H
Demeclociclina	—Cl	—H	—H	—H	—H
Metaciclina	—H	—CH <sub>3</sub> *	—OH	—H	—H
Doxiciclina	—H	—CH <sub>3</sub> *	—OH	—H	—H
Minociclina	—N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—H	—H	—H	—H

\*No existe -OH en posición 6 en metaciclina y doxiciclina

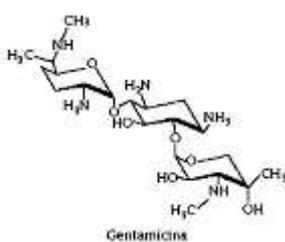
**Figura 5** Esquema general de las tetraciclinas.

por la industria farmacéutica. En su estructura localizamos cuatro ciclos y dependiendo de los radicales podemos ver un tipo u otro de tetraciclina. El mecanismo de acción de esta molécula está relacionado directamente con la traducción ya que se unen al ribosoma y bloquean la producción de proteínas, de forma que actúan como un bacteriostático (Chopra and Roberts, 2001).

### 1.4.4 AMINOGLUCÓSIDOS

Es otra familia de antibióticos de origen natural y también el género *Streptomyces*, un gram positivo, se encuentra implicado en su síntesis natural, aunque

elementos del género *Micromonospora*, éste un actinomiceto, también son capaces de

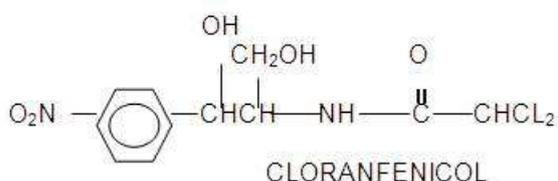


sintetizar estos antibióticos. Son moléculas que actúan a nivel de traducción ya que tras entrar en la bacteria se fijan a la subunidad 30s del ribosoma y lo inutiliza. La falta de recambio proteico se convierte en un verdadero problema en la membrana de forma que su acción última es crear poros que desestabilicen la membrana interna (van Hoek *et al.*, 2011).

**Figura 6** Estructura de la Gentamicina.

Hay una cantidad apreciable de estos antibióticos como son gentamicina, tobramicina, kanamicina, estreptomycin... y también se han diseñado aminoglucósidos semisintéticos como la amikacina, derivada de la kanamicina.

#### 1.4.5 FENICOLES Y CLORANFENICOL



**Figura 7** Estructura del cloranfenicol.

Son moléculas inicialmente obtenidas a partir de otra especie del género *Streptomyces*, concretamente la especie *S. venezuelae* pero en la actualidad su producción es sintética.

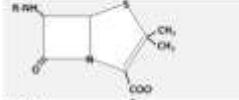
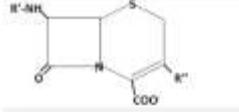
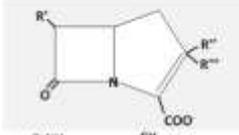
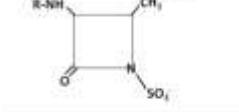
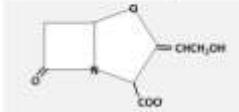
Estos antibióticos actúan sobre la subunidad 50s del ribosoma, de forma que impiden la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la elongación de la cadena peptídica que se está formando en el ribosoma (van Hoek *et al.*, 2011).

#### 1.4.6 BETA-LACTÁMICOS

Son antibióticos derivados de los que inicialmente se identificaron en el género *Penicilium*, primariamente *Penicilium notatum* y actualmente *Penicilium chrysogenum*.

Después de que el hombre ha conseguido desentrañar la estructura química y la actividad de la penicilina, ha podido mejorar la molécula y diseñar derivados más eficientes. La estructura que le confiere actividad a este tipo de moléculas es el anillo beta-lactámico.

**Tabla 1** Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos (Suárez and Guidol 2009)

Anillo beta-lactámico	+ Anillo secundario	= núcleo del beta-lactámico	⇒ grupo antibiótico
			
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	<b>PENICILINAS</b> Benzilpenicilina, penicilina V, cloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina.
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7- $\alpha$ -cefalosporínico	<b>CEFALOSPORINAS</b> Cefazolina, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefotetán, cefotaxima, ceftazidima, cefepime.
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	<b>CARBAPENÉMICOS</b> Imipenem, meropenem, doripenem.
	Ninguno	Monobactamo	<b>MONOBACTÁMICOS</b> aztreonam
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/oxapenamo	<b>ACIDO CLAVULÁNICO</b>

La baja toxicidad de la misma se da porque tiene una diana específica en las bacterias, la pared bacteriana, y es así porque la estructura tridimensional del anillo beta-lactámico es semejante a la estructura que toma la unión D-alanina-D-alanina del peptidoglicano y compite directamente con esta estructura por alojarse en el centro activo de las enzimas encargadas de sintetizar la pared bacteriana, las PBPs o proteínas de unión a las penicilinas. Por la forma de actuación, es necesario que la bacteria esté en crecimiento para que este antibiótico sea efectivo. El bloqueo de las PBPs implica que el entramado que termina de definir el peptidoglicano, no se finaliza porque las uniones transversal de las largas cadenas paralelas de oligosacáridos que alternan residuos NAG-NAM no se pueden realizar, dejando el entramado endeble y a merced de la presión osmótica interna y provocando de este modo la rotura y muerte de la bacteria (Kong *et al.*, 2010).

Como se puede ver en la Tabla 1, dependiendo del anillo que acompaña al beta-lactámico tenemos diferentes grupos, de forma que si es un anillo dihidrotiacínico, el grupo que se genera es conocido como cefalosporinas (Suárez and Guidol, 2009). Esta modificación las hace más eficientes en su actuación y dentro de este grupo, según se modifiquen los radicales R' y R'' se han producido ya hasta cuatro generaciones diferente de cefalosporinas.

En el 2010 el valor total de consumo de antibióticos fue de 20,3 dosis por 1.000 habitantes y por día (DHD), un valor alto. En el caso de los antibióticos de uso general sistémico, cefalosporinas, España presentó un valor de DHD, en 2010, de 1,6. Es un valor en la media respecto a los países limítrofes, e inferior a los valores de Portugal o Francia,, que están en una horquilla entre el 1,81 y 3,58 de DHD. (European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, 2013). Esta utilización en ámbitos humanos de estos antibióticos genera una presión selectiva en favor de bacterias portadoras de mecanismo de resistencia y el uso sostenido y continuado de los mismos, es un riesgo a tener en cuenta sobre la creación y fijación de ecotipos con mecanismos específicos de resistencia.

### 1.5 RESISTOMA, EL ALMACÉN DE LOS GENES DE RESISTENCIA

Hasta ahora hemos tocado los conceptos de nicho ecológico, fitness, ecotipo, estructuras extracromosomales, antibióticos, mutación y genes como herramientas competitivas y evolutivas.

Un tipo de genes que se han ido desarrollando a lo largo del tiempo son los genes de resistencia frente a los antibióticos. La presencia de metabolitos secundarios que actúen sobre el crecimiento de otros seres ha sido comentado anteriormente como una forma de competir por un nicho se ha visto que en ecosistemas externos a los seres humanos se ha observado la existencia de muchos genes de resistencia frente a diferentes tipos y familias de antibióticos (Walsh and Duffy, 2013).

Otro aspecto que hay que empezar a considerar es que en un ecosistema complejo y estructurado, hay más de un ser vivo y hay más de una acción selectiva y las bacterias despliegan todo un conjunto de herramientas para defenderse, de forma que un gen o mecanismo puede estar relacionado directa o indirectamente con la resistencia frente a uno o varios antimicrobianos. Todos estos elementos, genes y estructuras diseñadas y definidas para hacer frente a metabolitos dañinos se pueden considerar



**Figura 8** Esquema de una bacteria, del resistoma intrínseco y de las condiciones externas. Se puede ver que el resistoma intrínseco se relaciona con los determinantes clásicos cromosómicos y que puede ser modificado tanto por el ambiente como por genes circulantes (Esquema adaptado de Olivares Pacheco *et al.*, 2013).

como un conjunto denominándose “**resistoma**” y recientemente se ha definido un **resistoma intrínseco** de cada bacteria o especie como el conjunto de elementos que contribuyen directa o indirectamente en la resistencia a antibióticos y su presencia es independiente a una exposición previa a dicho antibióticos y no provienen de una transferencia génica horizontal (Olivares Pacheco *et al.*, 2013). Esto da pie a considerar todos los genes y mecanismos que se ubiquen en elementos extracromosómicos y mutaciones génicas tras la presión selectiva que se puedan encontrar en las bacterias y que forman parte del **resistoma extrínseco**.

### 1.5.1 RESISTOMA Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

La bacteria puede presentar 5 mecanismos generales de resistencia a los antibióticos:

- **Expulsión activa**
- **Modificación enzimática**
- **Sobreproducción de dianas**
- **Alteración de la permeabilidad de la membrana**
- **Modificación de la diana o síntesis de dianas alternativas.**

Con estas estrategias, la bacteria intenta defenderse de los antibióticos de forma que observando cómo actúan y teniendo en cuenta las definiciones de resistoma intrínseco y extrínseco, tres mecanismos se pueden considerar como íntimamente relacionados al resistoma intrínseco (modificación de la diana, sobreproducción de dianas y cambios en la permeabilidad), otro muy relacionado con el resistoma extrínseco (expulsión activa) y el resto pueden identificarse con ambos (Modificación enzimática) (Olivares Pacheco *et al.*, 2013).

*E. coli* presenta un resistoma intrínseco pero no se considera al gen *ampC* cromosómico, codificante de una beta-lactamasa tipo AmpC, que presenta actividad frente a diferentes penicilinas, aunque otros genes como *ampG*, encargado del reciclado de la mureína si puede incluirse (Olivares Pacheco *et al.*, 2013). Dentro del resistoma extrínseco, o genes de resistencia circulantes podemos encontrar genes que confieren resistencia a antibióticos de origen natural, como pueden ser resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, penicilinas y derivados y aminoglucósidos, y genes que aportan resistencia frente a antibióticos sintéticos como pueden ser las fluoroquinolonas, sulfamidas y trimetoprim. En la tabla 2 se presentan los genes más comunes en *E. coli* del resistoma extrínseco con sus mecanismos de resistencia que codifican.

**Tabla 2** Genes más comunes identificados que se consideran resistoma extrínseco de *E. coli*

Familia	Antibiótico	Genes del resistoma externo	Mecanismo de resistencia
<b>Aminoglucósidos</b>	amikacina	<i>aac(6')-I, armA, npmA, rmtB, rmtE</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	gentamicina	<i>aac(3')-I, aac(3')-II, aac(3')-IV, ant(2'')-I, armA, npmA, rmtB, rmtE</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	tobramicina	<i>aac(6')-I, aac(3')-II, aac(3')-IV, ant(2'')-I, armA, npmA, rmtB, rmtE</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	kanamicina	<i>aph(3')-I, aph(3')-II, aph(3')-IV, ant(2'')-I, aac(3')-II, aac(3')-IV, aac(6')-I, armA, npmA, rmtB, rmtE</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	estreptomicina	<i>aph(3''), aadA, strA, strB, sat<sup>*</sup>, armA, npmA, rmtB, rmtE</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
<b>Fenicoles</b>	cloranfenicol	<i>floR, catA, catB2, cmlA</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	tianfenicol	<i>floR, catA, catB2, cmlA</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	azidamfenicol	<i>floR, catA, catB2, cmlA</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
	florfenicol	<i>floR</i>	Expulsión activa
<b>Quinolonas</b>		<i>qepA, qnrA, qnrB, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	Modificación enzimática, expulsión activa
<b>Sulfamidas</b>		<i>sul1, sul2, sul3</i>	Modificación enzimática
<b>Tetraciclinas</b>		<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D)</i>	Expulsión activa
<b>Trimetoprim</b>		<i>dfrA<sup>+</sup>, dfrB<sup>+</sup></i>	Modificación enzimática
<b>Beta-lactámicos</b>		<i>bla<sub>CTX-M</sub>, bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>OXA</sub>, bla<sub>FOX</sub>, bla<sub>GES</sub>, ampC, CMY</i>	

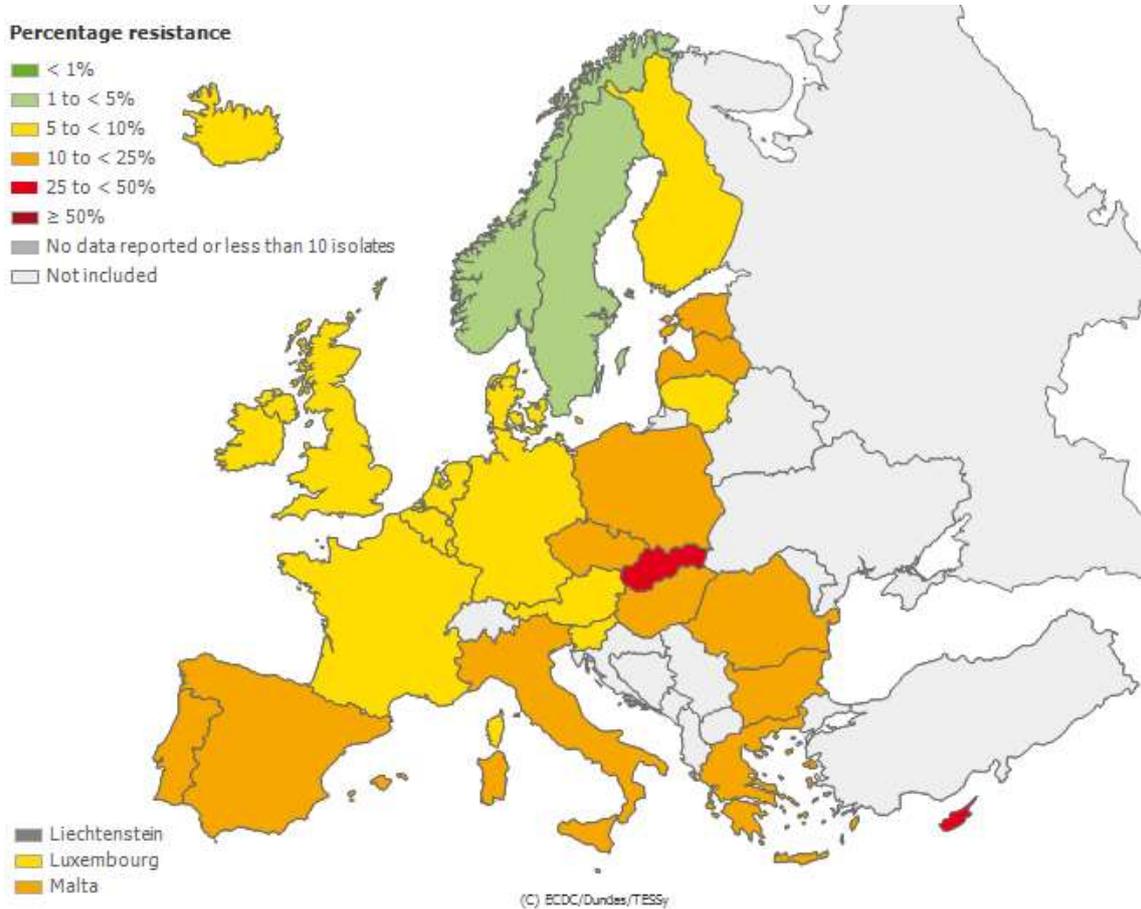
\*no son determinantes aminoglucosídicos pero codifican una estreptomicin-acetil transferasa

+ Incluye más de 20 variantes

· Incluye 4 variantes

### 1.5.2 BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs), UN ARMA PODEROSA

El sistema Europeo EARSS realiza un seguimiento de las cepas resistentes a diferentes antibióticos en la Unión Europea. En la figura 9 se presentan los datos correspondientes a las cepas invasivas de *E. coli* resistentes a cefotaxima en los distintos países de la Unión Europea según datos de 2011. España se presenta con una frecuencia



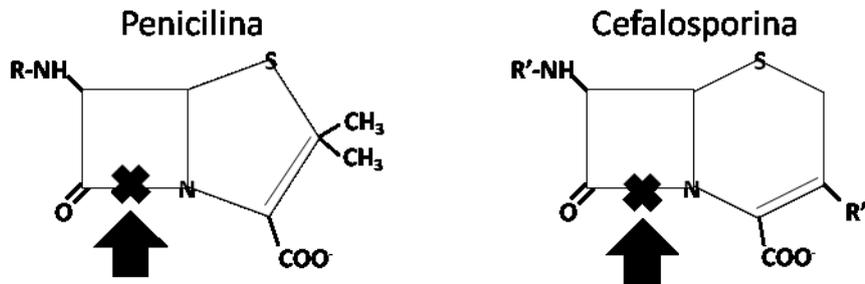
**Figura 9** Prevalencia de cepas invasivas de *E. coli* resistentes a cefotaxima en países de la Unión Europea.

que oscila entre el 10-25%, un valor elevado y similar a países como Portugal o Italia.

Existen varios mecanismos que pueden estar implicados en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (cefotaxima), aunque el más frecuente es por producción de enzimas beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

### 1.5.2.1 ORIGEN DE LAS BLEE Y MECANISMO DE ACCIÓN

Esta resistencia a cefotaxima se debe a diferentes mecanismos, del cual, el más diseminado y popular es la presencia de enzimas modificadoras denominadas Beta-lactamasas. Las primeras enzimas detectadas fueron la TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (Bradford, 2001). Son enzimas que actúan sobre el anillo beta-lactámico de las penicilinas hidrolizándolo y definiéndose como penicilinasas.



**Figura 10** Mecanismo de acción de las Beta-lactamasas .

Mutaciones puntuales en estas enzimas, sobre todo en la zona de los centros activos, derivaron en la aparición de nuevas variantes con una capacidad de detección y acutación mayor, de forma que no se centraban en las penicilinas, sino en una mayor cantidad de beta-lactámicos.

Estas enzimas se denominaron beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) siendo TEM-3 y SHV-2 y sobre el 2000 se detectó la presencia de una nueva familia denominada CTX-M. La definición de BLEE es implica la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactams pero no son capaces de actuar sobre cefamicinas y carbapenems ( Bush and Jacoby, 2010; Bradford, 2001).

### 1.5.2.2 ORIGEN DE LA FAMILIA CTX-M

La primera BLEE fue descrita fue aislada en Sur América y en Europa de forma simultánea y fue denominada CTX-M-1 en 1989, pero no fue la primera detectada porque en 1986 en Japón se aisló una enzima con capacidad de hidrolizar ceforaxima que fue denominada FEC-1 (Faecal *E. coli* 1) y que tras una comparación se vio que pertenecía a ese novedoso grupo denominado CTX-M, rebautizándose como CTX-M-3 (Cantón *et al.*, 2012; Bonnet, 2004;). A partir de estas BLEEs detectadas, se

identificaron más variantes y se clasificaron en cinco grupos diferentes según su secuencia de ADN. Estos grupos son: Grupo CTX-M-1, Grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9 y grupo CTX-M-25 (Cantón and Coque, 2006; Bonnet, 2004).

Los orígenes de esta familia de enzimas se remonta a una enzima cromosómica localizada en un género, *Kluivera*, y a diferencia de lo esperado, no todas desciende de una misma *Kluivera* sino que son de varias o incluso de hibridación de éstas (tabla 3).

**Tabla 3** Origen de los diferentes genes que definen los grupos de CTX-M

Genero <i>Kluivera</i>	Gen originario	Grupo CTX-M	Referencia
<i>K. cryocrencens</i>	<i>kluC</i>	Grupo CTX-M-1	(Decousser et al., 2001)
<i>K. ascorbata</i>	<i>KluA</i>	Grupo CTX-M-2	(Humeniuk et al., 2002)
<i>K. gregoriana</i>	<i>kluG</i>	Grupo CTX-M-8	(Poirel et al., 2002)
<i>K. gregoriana</i>	<i>kluY</i>	Grupo CTX-M-9	(Olson et al., 2005)
<i>K. gregoriana</i>	<i>bla<sub>CTX-M-78</sub></i>	Grupo CTX-M-25	(Rodríguez et al., 2010)

### 1.5.2.3 CLASIFICACIÓN DE LAS BLEES

Se han presentado tres clasificaciones una de criterios estructurales, (Ambler, 1980), una segunda según criterios de sustrato y actuación (Bush and Jacoby, 2010) y una tercera desde el punto de vista epidemiológico y clínico (Giske *et al.*, 2009). De estas tres clasificaciones, las dos primeras son las más utilizadas.

Bush y Jacoby presentan 3 grandes grupos con divisiones (1, 2, 3), Ambler define cuatro grupos bien diferenciados (A, B, C y D) y Giske tres (BLEE<sub>A</sub>, BLEE<sub>M</sub>, BLEE<sub>CARBA</sub>). Concretamente, las BLEEs de las familias TEM, SHV y CTX-M, se clasifican como de clase 2be según Jacoby, clase A según Ambler y se engloban en el grupo BLEE<sub>A</sub> de Giske.

En la tabla 4 se muestra ambas clasificaciones de Bush y Jacoby y Ambler.

**Tabla 4** Agrupación de las dos clasificaciones de BLEEs (Drawz and Bonomo, 2010)

Clasificación molecular (Ambler, 1980)	Clasificación funcional (Bush, Jacoby, Medeiros (2010))	Sustratos preferidos	Inhibición por		Beta-lactamasas representativas
			CLV o TZ	EDTA	
A (serin penicilinasas)	2a	Penicilinas	+	-	PC1 ( <i>S. aureus</i> )
	2b [penicilinasas]	Penicilinas, C1G	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be [beta-lactamasas de amplio espectro]	Penicilinas, C1G-C4G, monobactámicos	+	-	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms
	2br	Penicilinas	-	-	TEM-30, SHV-10, SHV-72
	2c	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
	2e	C1G-C4G	+	-	CepA, FEC-1
B (metalo-beta-lactamasas)	2f [serin-carbapenemasas]	Carbapenémicos	Variable	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
	3a [metalo-B-lactamasa]	Carbapenémicos	-	+	IMP-1, VIM-1, Cer-A, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	3b [metalo-B-lactamasa]	Carbapenémicos	-	+	CphA, Sfh-1
C (cefalosporinasas)	1	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-37
D (oxacilinasas)	2d [cloxacilinasas]	Cloxacilina	Variable	-	OXA-1 a OXA-10
	2de	C1G- C4G	Variable	-	OXA-11 a OXA-15
	2df [carbapenemasas]	Carbapenémicos	Variable	-	OXA-23, OXA-48

#### 1.5.2.4 EVOLUCIÓN DE LAS CTX-M Y DISPERSIÓN

De todos los grupos comentados, el último aparecido, está siendo el que mayor éxito adaptativo presenta ya que está creciendo en diversidad de forma muy rápida y se está asentando en muchos lugares y desplazando a otras BLEEs ya presentes anteriormente en esos nichos (Livermore *et al.*, 2007). Se puede decir que sufrido una expansión muy importante y en poco tiempo, de forma que todo ese proceso expansivo se puede dividir en tres fases (Cantón *et al.*, 2012):

- Aparición de las diferentes familias de CTX-M (1986 – mediados de los 90 del Siglo XX).
- Diferenciación rápida de las CTX-M aparecidas dando una gran variabilidad (1994 – 2000).
- Dispersión y globalización de las CTX-M (del 2000 a la actualidad).

La detección de estas BLEEs en elementos génicos de transmisión horizontal (plásmidos) y el descubrimiento de elementos móviles en sus entornos (Elementos de Inserción, transposones, integrones) es una de las razones que se esgrimen para intentar dar una explicación a esta situación (Cantón *et al.*, 2012; Toleman *et al.*, 2006).

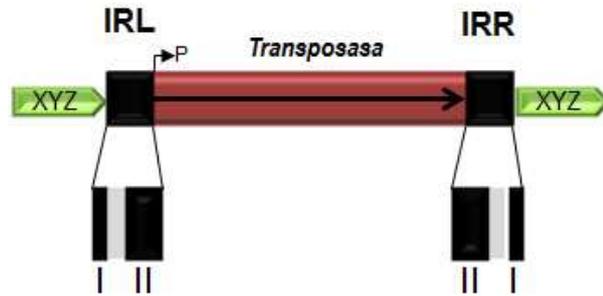
#### 1.5.3 SISTEMAS DE DISPERSIÓN, LA MOVILIDAD DEL RESISTOMA

Durante todo este capítulo, esporádicamente se han nombrado de forma indirecta o directa unos elementos genéticos que presentan una característica importante y es que son móviles o movilizables. Estos elementos son plásmidos conjugativos y plásmidos movilizables, transposones, integrones y elementos de inserción. Todos ellos facilitan la movilización, adquisición o dispersión de muchos genes, haciendo así que el resistoma exógeno sea muy diverso y variable. Muchos de los genes nombrados anteriormente se encuentran rodeados o inmersos en estas estructuras y es importante presentarlas.

### 1.5.3.1 ELEMENTOS DE INSERCIÓN Y TRANSPOSONES

#### Elementos de inserción

Los elementos de inserción o ISs son estructuras génicas de un tamaño entre 700 pares de bases (700 pb) y 1.000 pares de bases (1.000 pb), son secuencias de ADN con una estructura más o menos constante y una parte de este ADN codifica una enzima que es la encargada de movilizar toda la estructura, esta enzima es denominada Transposasa. A derecha e izquierda de



esta secuencia se encuentran unas secuencias repetidas e invertidas que reciben los nombres de IRL y IRR (Left Inverted Repeat y Right Inverted Repeat) de un tamaño entre 10 pb y 40 pb. Justo fuera de toda la estructura, a la izquierda de la IRL y a la derecha de la IRR hay una pequeña secuencia de ADN importante, se denomina DR (Direct Repeat), representadas como XYZ, porque es una corta secuencia de nucleótidos que se encuentra repetida pero no invertida, a ambos lados de la IS y es importante porque esta secuencia es la que reconoce la transposasa para realizar su actividad de movilización. Ambas secuencias repetidas e invertidas tienen una misma estructura, se subdividen en dos dominios llamados I y II, pero la IRL es importante para la expresión y actividad de la transposasa, porque en el dominio I se localiza el promotor para la expresión de la enzima y además actúa como marca de reconocimiento para la transposasa y el dominio II es la sección de ADN que necesita la transposasa reconocer para iniciar la movilización. Esta es la organización y estructura general, pero pueden existir ISs que presenten variaciones (Mahillon and Chandler, 1998).

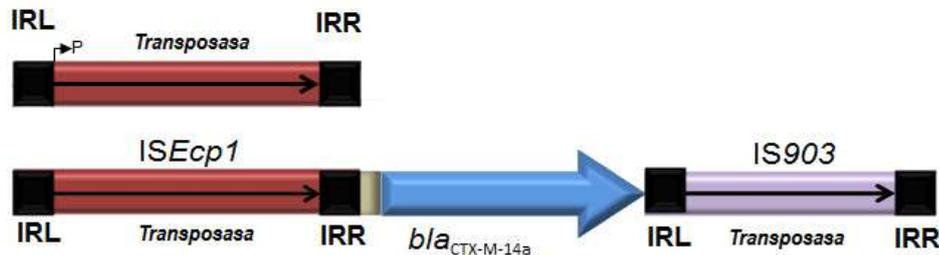
**Figura 11** Esquema general de una Secuencia de Inserción (Mahillon and Chandler, 1998).

De estos elementos se puede decir que hasta la fecha (10 de junio de 2013) hay definidas 25 familias de ISs que engloban a la gran mayoría de ISs identificadas hasta el momento según la página de referencia <https://www-is.biotoul.fr/> y su nomenclatura, según la página anterior consiste en las letras IS y un número consecutivo, aunque existen muchas ISs nombradas de forma diferente, como la *ISEcp1*, una IS importante relacionada directamente con las BLEEs de tipo CTX-M.

Estos elementos tienen dos formas de movilizarse, **conservativa** y **replicativa**. Son dos formas definidas y se diferencian en que la replicativa genera una copia del elemento en la nueva zona de salto, mientras que la conservativa implica la movilización física de la IS, cerrando el gap que genera en el salto hacia la nueva ubicación.

### Transposones

La existencia de una gran variedad de ISs puede dar como resultado la ubicación de dos de ellas en una posición cercana, flanqueando un fragmento de ADN y que después de una señal que una IS detecta como disparadora del mecanismo de salto, se da una transposición de las dos ISs a la vez y arrastrando el fragmento de ADN localizado entre ambas.



**Figura 12** Esquema de un transposón y comparación con una IS. (Adaptada de deToro, 2013).

Este evento se ha dado y la estructura formada así se denomina Transposón. Existe una gran variedad de transposones y su nomenclatura se basa en las letras Tn y un número (Roberts *et al.*, 2008; Bennett, 2004).

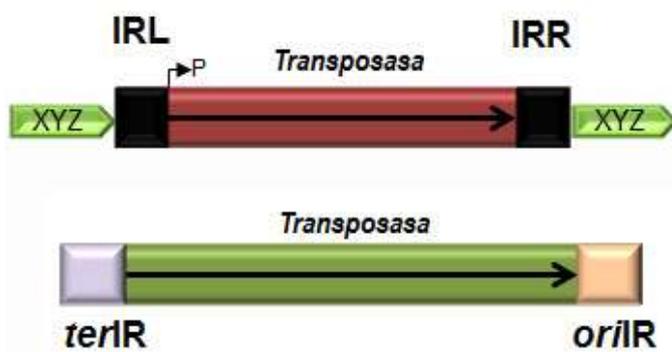
El fragmento de ADN ubicado en el interior del transposón puede contener una serie de determinantes, de muy diversa naturaleza, pero en este estudio tienen especial relevancia los determinantes que otorgan resistencia a los antibióticos y más concretamente los relacionados con BLEEs.

Como se ha comentado antes, un transposón está formado por dos ISs que flanquean a él o los determinantes de resistencia. La forma de moverse, generalmente es conservativa, aunque algunos como la propia IS26 lo realiza de forma replicativa. Las ISs pueden ser la misma a ambos lados o diferentes, de forma que tenemos transposones homólogos y heterólogos. Un transposón heterólogo muy común y estable es el que forma *ISEcp1* con *IS903* (Bennett, 2008). En los transposones hay dos genes de

transposasa, de forma que podrían ser ambos genes los que se activasen en el momento de la movilización, pero la norma es que sea solo uno de los dos. Hay casos en los que solo hay un gen de transposasa activo ya que en el otro se ha dado algún tipo de mutación que lo hace inviable.

### ISCR

El estudio de unas estructuras de aglutinamiento de determinantes de resistencia dio como resultado la detección de una sección de ADN que se repetía en todas ellas, de y con una organización interna constataste que se denominó CR (common región). El estudio de esta secuencia en bases de datos dio como resultado que la secuencia, en unos casos era idéntica a la *IS91* y otras veces se asemejaba mucho a esa IS, denominándose entonces *IS91-like*, pero presentaban una diferencia importante frente a la estructura normal de una IS ya que los elementos repetidos e invertidos de los extremos desaparecen para dar lugar a unos elementos diferentes y con diferente función. Esta situación hizo que se renombrasen como ISCR. Dentro de la ISCR, se identificó inicialmente una sección de ADN de alrededor de 500 pb codificantes y se denominó *ORF513* ya que no se le asignó función. Posteriormente, cuando se descubrió que los elementos ISCR eran unos elementos móviles con una capacidad replicativa importante mediante el mecanismo de círculo rodante, sistema equivalente al utilizado por algunos plásmidos, se consideró rebautizar la ORF como una transposasa. También



**Figura 13** Comparación de estructuras entre IS e ISCR. (Adaptada de deToro, 2013).

se detectó los equivalentes a las IRs de las IS, definiendo la sección de la izquierda como *terIS* y la de la derecha *oriIS*. Estos nombres se refieren a zonas con señales de terminación y de origen de replicación (Toleman *et al.*, 2006).

El mecanismo de replicación de esta estructura efectúa una copia de una sección de ADN que se localiza más allá del propio ISCR, de forma que moviliza de forma replicativa una cantidad significativa de ADN y si se encuentra cerca o adyacente a determinantes de resistencia, significa que es una herramienta de dispersión importante.

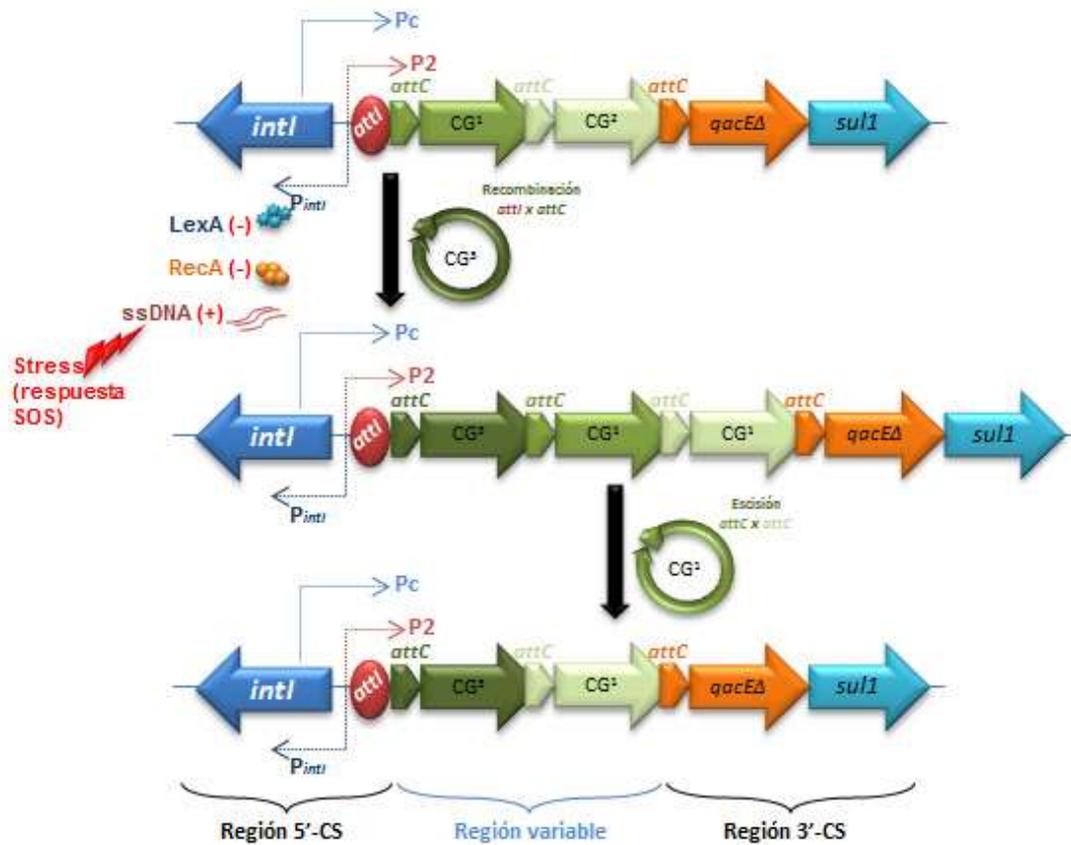
Hay identificados varios elementos ISCR, siendo ISCRI un elemento importante por su relación con BLEEs e integrones.

### 1.5.3.2 INTEGRONES

Los ISCR fueron detectados aguas debajo de unos elementos agregativos de determinantes de resistencia, estos elementos son los **integrones**. La definición de integrón más exacta sería “un mecanismo natural de captación, expresión y fijación de casetes génicos (CG) mediante un mecanismo de recombinación sitio-específico”.

Son estructuras más complejas que las descritas anteriormente y su capacidad de movilización viene limitada por el vehículo en el que se encuentren, ya que no tienen capacidad replicativa y dependen de transposones, plásmidos o ambos, de forma que podemos diferenciar entre integrones móviles e integrones cromosómicos, que por definición han perdido su capacidad de movilización (Cambray *et al.*, 2010).

Lo que define a un integrón es la presencia de un gen que codifica una integrasa (*intI*), es una enzima que pertenece a la familia de las tirosin-recombinasas y es la encargada de captar, organizar y escindir genes casetes. También es necesaria la existencia y viabilidad de un *attI*, un lugar de recombinación sitio-específico, que es la sección de ADN que identifica la integrasa para actuar en cuanto a los casetes génicos (CG) y por último, todo gen requiere de un promotor (Pc) viable para su expresión, así que es necesario que exista un Pc para expresar los casetes génicos y también puede existir un segundo promotor más fuerte P2. El estudio del Pc nos da una variedad de promotores que se pueden clasificar en varios tipos, fuertes PcS, débiles PcW, híbridos PcH (Jové *et al.*, 2010), amén de la existencia de un promotor para la expresión de la propia integrasa  $P_{intI}$  (figura 14).



**Figura 14** Modelo de incorporación y escisión de casetes genéticos de la estructura del integrón (deToro, 2013).

Dentro de las integrasas, hasta el momento, se han descrito cinco clases que difieren en su secuencia aminoacídica (*intI1*, *intI2*, *intI3*, *intISXT* o *intI9* e *intIHS*) (Stalder *et al.*, 2012; Cambray *et al.*, 2010). De estas cinco clases, las tres primeras son las más comunes.

Los elementos antes comentados son imprescindibles para determinar la presencia de un integrón, y tras el *attI* normalmente se encuentran los anteriormente denominados CGs. Estos CGs consisten en una secuencia codificante de ADN (*orf*) y un lugar de recombinación denominado *attC*, de forma que el *orf* contiene el determinante de resistencia al antibiótico en este caso y el *attC*, localizado en el extremo 3' del CG. Estos CGs se pueden encontrar fuera del integrón, circularizados y en esta conformación es como las integrasas los reconocen y por los que son captados. Los CGs se captan y se introducen justo detrás de la integrasa, de forma que puede haber más de un CG, con lo que la ordenación de los mismos puede dar una orientación del orden de

captación, siempre y cuando no se haya dado una reorganización interna. Esta región génica se denomina como región variable del integrón (figura 14).

Tras esta región, dependiendo del tipo de integrón, lo que lo define la clase de integrasa, se pueden identificar diferentes estructuras o regiones. En concreto, en los integrones de Clase 1 (formados por una *intI1*), podemos encontrar dos situaciones:

1. La presencia de una estructura conservada en todos ellos con dos genes, *qacEAI* y *sulI* consecutivos y en este orden
2. Ausencia de estos genes y estructura pero la presencia de genes homólogos, *qacH* y *sul3* con una IS entre medias.

Los integrones de Clase 1 que presentan la primera situación se denominan integrones clásicos y esta región recibe el nombre de segmento conservado 3' (3'-CS), mientras que los integrones de Clase 1 que presentan la segunda situación son definidos como defectivos por la ausencia de la región 3'-CS, aunque su función sigue por la presencia de los genes homólogos. El fragmento *intI-attI* está altamente conservado en todos los integrones y se denomina segmento conservado 5' (5'-CS) (figura 14, (Partridge, 2011; Cambray *et al.*, 2010)).

Los determinantes localizados dentro de integrones son muchos y concretamente los relacionados con la resistencia a antibióticos, se ha visto que son varias familias las que tienen representantes dentro de sus regiones variables y entre ellas están los genes que codifican beta-lactamasas (Partridge, 2011).

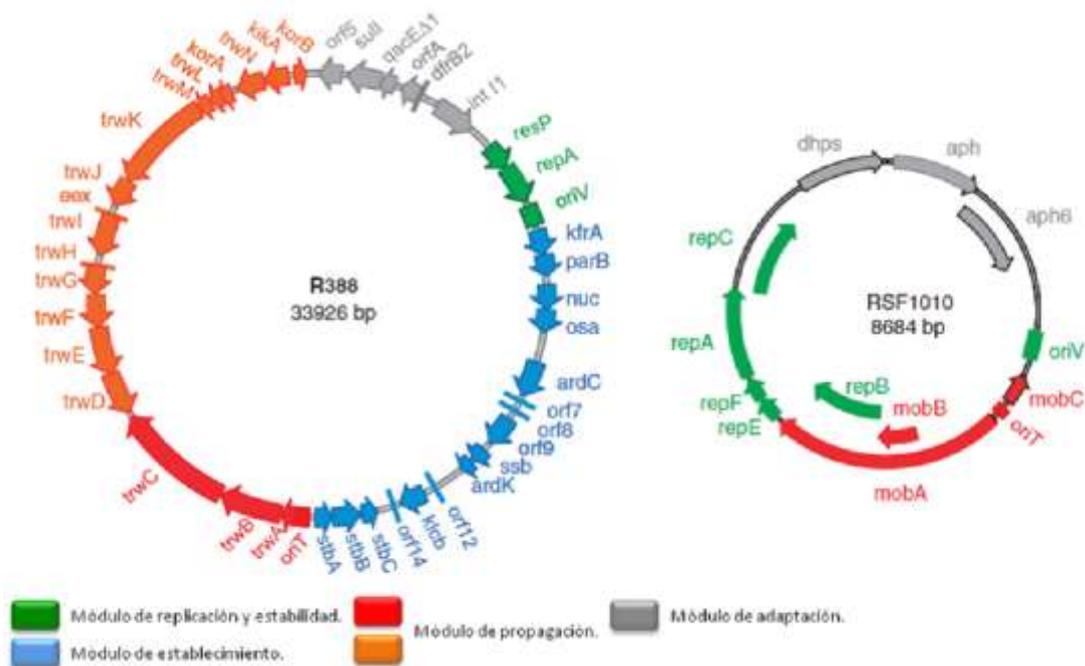
En la base de datos INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>) se presenta una gran cantidad de información sobre integrones.

### 1.5.3.3 PLÁSMIDOS

Por último, dentro de las bacterias existen elementos extracromosomales, referidos en apartados anteriores, moléculas de ADN circulares, de doble cadena con capacidad replicativa y transcriptiva autónoma e independiente del cromosoma bacteriano que pueden llegar a albergar en su estructura algunos o todos los elementos antes nombrados, además de otros tipos de genes necesarios para su correcto funcionamiento o relacionado con otras funciones de la bacteria. Son conocidos como **plásmidos**.

Están presentes en la gran mayoría de las especies bacterianas y en hongos también se han identificado, tienen un tamaño variable entre 2.000 pb (2 kb) y 400.000 pb (400 Kb) generalmente aunque pueden ser más grandes o pequeños. Todos ellos presentan una estructura base o esqueleto (plasmid backbone) que contienen los genes indispensables para su correcto funcionamiento. Estos elementos son el **módulo de replicación**, **módulo de estabilidad**, **módulo de conjugación**, **módulo de establecimiento** y **módulo de adaptación**. Algunos de estos elementos no son funcionales en determinados plásmidos, por ejemplo hay plásmidos con el módulo de conjugación activo pero los genes de movilización estar inutilizados. De todos estos módulos, los que suscitan especial interés para este estudio son el módulo de replicación y el módulo de adaptación (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011; Carattoli, 2009).

El primero, el de replicación o replicón, es el módulo encargado de mantener las copias necesarias del plásmido y de su estabilidad dentro de los distintos hospedadores donde se puede encontrar. En esta zona del backbone es donde se localiza el origen de replicación (*rep*) y las proteínas de unión (*ori*). También encontramos los factores de regulación de la replicación. Se han descrito hasta la fecha tres tipos diferentes de mecanismos, círculo rodante, por desplazamiento de hebra y theta, que son específicos de cada plásmido y esto es así por el tipo de proteínas codificadas en esta zona. Estos



plásmido, es decir, que la presencia o ausencia de un tipo de proteína implica un tipo de replicación y un número de hospedadores viables.

Otro aspecto importante es lo que se conoce como *rango de incompatibilidad* y es la cantidad de plásmidos que pueden coexistir dentro de un mismo hospedador. Dos plásmidos con el mismo replicón compiten directamente por la maquinaria replicativa del huésped y hace que no puedan coexistir juntos, de forma que uno de ellos, “el menos fuerte”, queda expulsado del hospedador. Cuando se da este caso se dice que la bacteria está purgada o que el plásmido expulsado ha sido expurgado por la bacteria. Una forma de evitar esta competición consiste en presentar más de un replicón en el plásmido (Carattoli, 2009).

El módulo de adaptación es el módulo considerado como variable o cajón de sastre ya que en él se pueden localizar diferentes tipos de genes, entre ellos los genes de resistencia. Básicamente en esta zona se adquieren genes que pueden dar una ventaja adaptativa al plásmido y por prolongación, a la bacteria.

La forma de identificar a los plásmidos inicialmente fue mediante el estudio del replicón que portan, así en 1988 Couturier y colaboradores desarrollaron un sistema de tipado de plásmidos en Enterobacterias basado en la hibridación con sondas específicas diseñadas sobre replicones de plásmidos tipo. Era un método que conllevaba una cantidad de trabajo grande y no reportaba demasiados beneficios ya que su fiabilidad no era muy buena. Posteriormente se han propuesto varios sistemas de tipado utilizando la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), que a la postre está siendo un método más rápido y más aceptado (Carattoli *et al.*, 2005a).

En pocas palabras, Mort era de esas personas que son más peligrosas que una bolsa llena de serpientes de cascabel. Estaba decidido a descubrir la lógica fundamental del Universo.

**Mort**

*--Terry Pratchett*

## OBJETIVOS

*"Hacer las cosas no requiere demasiado esfuerzo;  
en cambio, decidir qué hacer si lo requiere".*

*--Elbert Hubbard*



## 2 OBJETIVOS

---

Los objetivos de la presente tesis son:

- 1) Estudiar las variantes de BLEEs y sus entornos genéticos en los aislados clínicos de *E. coli* resistentes a cefotaxima procedentes del Hospital San Pedro de Logroño obtenidos durante un periodo de 3 años y determinar los grupos filogenéticos de dichos aislados
- 2) Estudiar la prevalencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEEs en muestras fecales de:
  - a. Pacientes del Hospital San Pedro
  - b. Personas sanas
  - c. Animales de compañía (perros)
- 3) Estudiar la prevalencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEEs en muestras de alimentos de origen animal
- 4) Caracterizar a nivel molecular las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs de personas sanas y enfermas, animales y alimentos:
  - 4.1.- Estudio de las variantes de BLEEs y sus entornos genéticos.
  - 4.2.- Tipado molecular de las cepas
  - 4.3.- Estudio de integrones y de genes de resistencia
  - 4.4.- Contenido plasmídico de las cepas



--Que el test Voigt-Kampff funcione bien es tan importante para ustedes como para mí.

--Ella no es androide --dijo Roser

--No lo creo --respondió Rick

--¿Por qué habría de mentir? --preguntó Rachael con vehemencia--. En todo caso mentiríamos al revés.

--Quiero un análisis de médula ósea --contestó Rick--. Es posible determinar orgánicamente si alguien es o no un androide. Sé que es largo y doloroso pero...

**¿Sueñan los androides con ovejas eléctricas?**

*--Philip K. Dick*

## MATERIAL Y MÉTODOS

*“Como no sabían que era imposible, lo hicieron.”*

*--Anónimo*



### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

#### 3.1 CEPAS CLÍNICAS DE *E. coli*

Se incluyeron en la tesis 98 aislados de *E. coli* resistentes a cefotaxima (CTX<sup>R</sup>) obtenidos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro de Logroño de pacientes diferentes en un periodo de 3 años (Febrero 2004 a Mayo de 2007).

#### 3.2 MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS Y ENFERMAS Y DE ANIMALES

Se analizaron las siguientes muestras fecales:

- 99 muestras fecales de pacientes del Hospital San Pedro, recibidas para coprocultivo en el laboratorio de Microbiología de dicho hospital en el periodo Junio- Julio 2008.
- 115 muestras de personas sanas, que no habían recibido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestras, obtenidas durante el periodo septiembre 2010 y enero 2011.
- 126 muestras de animales de compañía sanos (perros de la perrera municipal de Logroño) obtenidas entre marzo y Julio de 2009.

#### 3.3 MUESTRAS DE ALIMENTOS

Se tomaron un total de 360 muestras de alimentos crudos de origen cárnico durante dos periodos: a) En 2007-2009 se obtuvieron 295 muestras, el 93,2 % de las cuales en supermercados y grandes superficies de Logroño y el 6,8 % de muestras de animales de caza destinados a consumo humano; b) En 2011 se obtuvieron 72 muestras, todas ellas en supermercados y grandes superficies del área metropolitana de la ciudad de Logroño.

Considerando ambos periodos de tiempo, se muestrearon 20 carnicerías y 6 supermercados y grandes superficies. El origen de las muestras fue el siguiente: 155 de pollo, 77 de cerdo, 56 de ternera, 23 de cordero, 20 de caza (ciervo, corzo, faisán, perdiz, pato, liebre, conejo, tordo, cabra), 12 de pavo, 8 conejo y 9 de carne picada (ternera/cerdo).

### 3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS Y DE LAS MUESTRAS FECALES

Para la obtención de aislados en los diferentes materiales biológicos recolectados (alimentos y heces), se siguió el mismo protocolo, exceptuando el paso inicial.

Se tomaron 3 g. de alimento (para muestras de alimentos) o una torunda de algodón estéril impregnada en heces (en el caso de las muestras fecales). En ambos casos se sumergió la muestra (de alimento o heces) en un tubo con 3 ml de solución salina estéril 0,9 % (m/v). Tras hidratación de la muestra y agitado fuerte mediante vortex, se prepararon diferentes diluciones para su siembra en placas petri con medios selectivos: Agar McConkey (Becton Dickinson & Co.), Agar Levine (Becton Dickinson & Co.) y Agar Levine suplementado con 1mg/L de cefotaxima sódica (Sigma, Levine-CTX), con el objetivo de poder aislar cepas de *E. coli* (Agar McConkey y Agar Levine) y cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> y potencialmente productoras de BLEEs (agar Levine-CTX). Estas placas se incubaron a 37° C durante 24/48 horas. Las placas de Agar McConkey y de Agar Levine fueron utilizadas para detectar y evaluar el crecimiento de Enterobacterias lactosa positivas y de *E. coli* en las muestras, respectivamente. Se tomaron 2 colonias con morfología de *E. coli* por muestra de las placas Levine-CTX, las cuales fueron identificadas y posteriormente caracterizadas para ver si presentaban el fenotipo BLEE.

La descripción morfológica de colonias sospechosas de ser *E. coli* creciendo en Agar Levine, es la siguiente: colonias redondas, de borde definido, coloración oscura o coloración oscura con iridiscencia verde metálico. Además la presencia de colonias rosadas en las placas de Agar McConkey, ayuda a la identificación de las mismas. A estas cepas, posteriormente, se les aplicaron las pruebas bioquímicas descritas para identificación de género y especie. Asimismo, se realizó la identificación molecular de la especie *E. coli* mediante PCR especie-específica.

En el caso de las muestras obtenidas a partir de las heces de personas enfermas, además de aplicar el protocolo anteriormente descrito, se utilizaron placas comerciales cromogénicas Agar chromID ESBL (BioMerieux) que permite la identificación de diferentes especies de Enterobacterias productoras de BLEEs, entre ellas *E. coli* (colonias de color marrón-burdeos).

Todos los aislados de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> obtenidos fueron conservados a -80° C en tubos criogénicos.

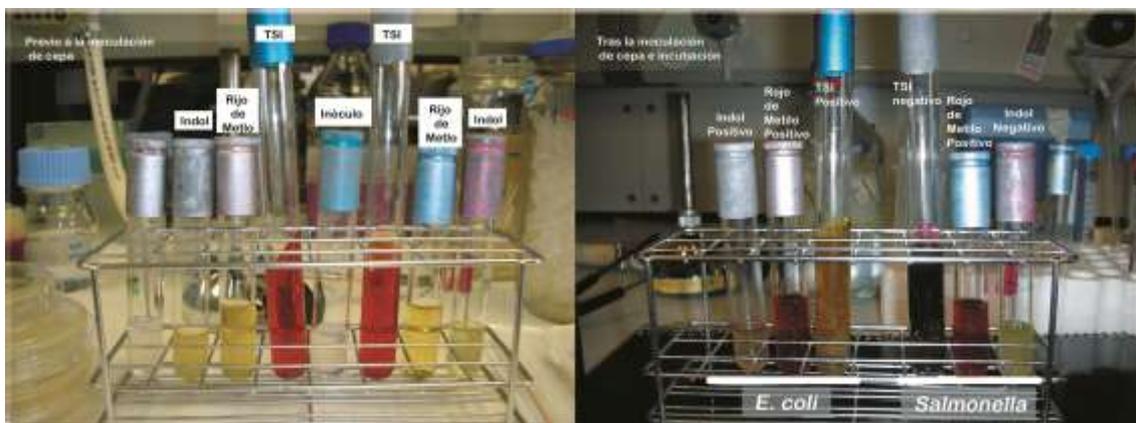
### 3.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

Tras la siembra de la suspensión de material biológico y selección de aislados, se procedió a la identificación de los aislados, en primer lugar por pruebas microbiológicas y bioquímicas clásicas (tinción de gram, y las pruebas del indol, rojo de metilo y crecimiento en agar triple-sugar-iron (TSI)).

Para poder realizar todas estas pruebas, previamente se hace necesario tener el aislado fresco, por tanto el día anterior se siembra en placas de BHI-agar y se deja crecer a 37° durante toda la noche.

**Prueba del Indol:** Se inocula una suspensión en el tubo con el medio de crecimiento (10 g de peptona de soja (Panreac) y 5 gramos de NaCl (Panreac) por 1 L de agua destilada). Tras esto, se deja incubando durante 24 horas. Después de este tiempo, la prueba se revela añadiendo al tubo con el aislado crecido unas gotas de Reactivo de Kovack (Panreac).

**Prueba de Rojo de Metilo:** Se inocula el microorganismo en el medio específico rojo-metilo y se deja en la estufa a 37° C durante 24 horas. Se revela la prueba añadiendo reactivo Rojo-Metilo (Panreac).



**Figura 16** Imagen de las pruebas bioquímicas. A la izquierda se presentan los medios previa inoculación y a la derecha se presenta una batería de pruebas positivas y negativas.

**Prueba de Agar Triple Sugar Iron (TSI).** Se preparan tubos con medio (TSI) (Becton Dickinson & Co.) en slant. Con un asa de siembra en profundidad previamente flameada y enfriada, se toma una cantidad de aislado fresco y se introduce en el agar del TSI hasta llegar casi al fondo del tubo, posteriormente se saca el asa despacio y se siembra en estría la superficie del slant con la punta del asa. Después se deja incubando a 37° C durante 22 horas y tras este tiempo, se observan los resultados del crecimiento del aislado.

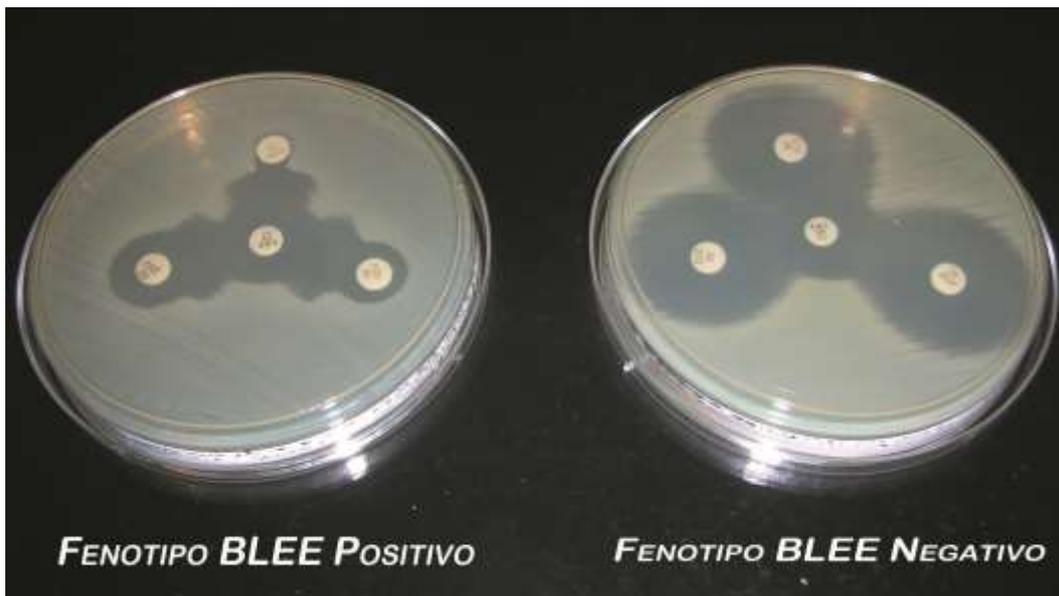
### 3.6 ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

#### 3.6.1 DETECCIÓN DEL FENOTIPO BLEE

Los aislados obtenidos anteriormente en las diferentes muestras fueron sometidos a la prueba de doble disco para determinar la presencia del fenotipo característico que identifica a cualquier aislado como portador de BLEE. La prueba ha sido modificada, partiendo de la publicada por Jarlier en 1988.

Se trabaja a partir de un aislado fresco, se prepara un tubo con 3 ml de solución salina estéril 0,9 % (m/v) y se suspende una cantidad de aislado suficiente como para conseguir una turbidez 0,5 MacFarland. Una vez conseguido, con un hisopo de algodón estéril, se introduce en la suspensión, se empapa bien y después se siembra en Mueller Hinton agar (MH-agar) (Becton Dickinson & Co.) de forma homogénea. El objetivo es conseguir un crecimiento homogéneo del aislado por toda la placa para poder ver los efectos de los antibióticos en su crecimiento.

Tras el sembrado en esterilidad, en esterilidad se coloca una serie de discos de papel impregnados con diferentes antibióticos sobre la placa. Los discos son comerciales y con las concentraciones adecuadas para la prueba. La posición de los mismos no es aleatoria y es importante respetar las distancias. En el centro de la placa sembrada se aplica un disco impregnado con amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)(10/20 µg) y a una distancia de 1,5 cm se ponen otros tres discos, cefotaxima (CTX)(30 µg), ceftazidima (CAZ)(30 µg) y aztreonam (ATM)(30 µg). Una vez puestos todos los discos, la placa se deja incubando a 37° C en una estufa entre 16 y 20 horas y tras la incubación se detecta el típico aumento del halo característico del fenotipo BLEE (figura 17).



**Figura 17** Prueba de doble disco modificada para la detección de fenotipo BLEE.

### 3.6.2 TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR

Se define como una técnica de sensibilidad semicuantitativa basada en los trabajos de Kirby y Bauer. Para ello se han utilizado discos impregnados con concentraciones estándar de antibióticos. Estos discos son comerciales y presentan siempre la misma concentración de antibiótico, concentración recomendada por los estándares estadounidenses del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), estándares y protocolos que se revisan todos los años. Una cantidad de aislado fresco se introduce en 3 ml de solución estéril 0,9 % (m/v) consiguiendo una suspensión bacteriana 0,5 McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) y con un hisopo de algodón se siembra de forma homogénea dos placas Petri de MH-agar. Los discos de antibiótico se colocan sobre la superficie del medio sembrado y se incuba a 37° C durante 16-20 horas.

Antibióticos testados por difusión en agar y puntos de corte en los halos de inhibición utilizados (CLSI,2012) se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5** Antibióticos utilizados y puntos de corte (CLSI, 2012)

Antibiótico	Concentración ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )	Halo de inhibición (en mm)		
		R	I	S
Ácido nalidíxico (NAL)	30	$\leq 13$	14-18	$\geq 19$
Ciprofloxacino (CIP)	5	$\leq 20$	21-30	$\geq 31$
Amikacina (AMK)	30	$\leq 14$	15-16	$\geq 17$
Estreptomocina (STR)	10	$\leq 11$	12-14	$\geq 15$
Gentamicina (GEN)	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Kanamicina (KAN)	30	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
Tobramicina (TOB)	10	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Amoxicilina-Ác. clavulánico (AMC)	20 + 10	$\leq 13$	14-17	$\geq 18$
Ampicilina (AMP)	10	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
Aztreonam (ATM)	30	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$
Ceftazidima (CAZ)	30	$\leq 17$	18-20	$\geq 21$
Cefotaxima (CTX)	30	$\leq 22$	23-25	$\geq 26$
Cefoxitina (FOX)	30	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
Imipenem (IMP)	10	$\leq 19$	20-22	$\geq 23$
Tetraciclina (TET)	30	$\leq 11$	12-14	$\geq 15$
Cloranfenicol (CLO)	30	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
Sulfamidas(SUL)	300	$\leq 12$	13-16	$\geq 17$
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	1,25 + 23,75	$\leq 10$	11-15	$\geq 16$

### 3.7 EXTRACCIÓN DE ADN

Previa a la técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), se extrae el ADN a los aislados con los que se va a aplicar dicha técnica. Para ello se parte de un cultivo fresco del microorganismo en BHI-agar, del microorganismo, se resuspende una colonia aislada en 500  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se agita unos segundos y se hierve a 100° C durante 8 minutos. Tras este tiempo, se vuelve a agitar vigorosamente con un vortex y después se centrifuga a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) en una microcentrífuga obteniendo un sobrenadante transparente y un precipitado blanquecino. El sobrenadante se traspara a un eppendorf, se mide su concentración con el Nanodrop buscando la concentración óptima de 400  $\mu\text{g}$  por mililitro, aunque la horquilla es amplia (200  $\mu\text{g}$  – 900  $\mu\text{g}$ ) y se conserva a 4° C hasta su utilización.

### 3.8 REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Gran parte de los ensayos e identificaciones se han realizado mediante la técnica de la PCR. A continuación se presentan tanto los componentes como las cantidades y concentraciones de los mismos utilizados en dicha técnica. Estos datos son generales y

hay determinadas pruebas de PCR que requieren cambios, en ese caso se incidirá en esos cambios.

**Tabla 6** Reactivos necesarios para realizar la PCR y concentraciones utilizadas

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de la reacción
Cebador “forward” (Sigma Aldrich)	25 $\mu$ M	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ M
Cebador “reverse” (Sigma Aldrich)	25 $\mu$ M	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ M
BIOTAQ <sup>TM</sup> DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ $\mu$ L	0,3 $\mu$ L la	1,5 U
Tampón de reacción NH4 (Bioline)	10 X	5 $\mu$ L	1 X
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	1,5 $\mu$ L l	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	10 mM	1 $\mu$ L	0,2 mM
ADN		10 $\mu$ L	
Agua miliQ estéril		Hasta 50 $\mu$ L	

Como se puede observar en la tabla 6, no se especifican los cebadores porque son específicos del gen o segmento de ADN que se intenta identificar en el aislado. A continuación se detallan los diferentes cebadores, así como las condiciones para su correcto funcionamiento y su respectiva bibliografía.

Los volúmenes especificados anteriormente son los requeridos cuando el amplificado o amplicón positivo obtenido se debe secuenciar. En caso de no ser necesaria su secuenciación, sino que interesa el dato de su presencia o ausencia, todos los volúmenes que se preparan son la mitad de los especificados, de forma que en vez de tener 50  $\mu$ L por muestra, se tienen 25  $\mu$ L por muestra.

La prueba se realiza mezclando todos los reactivos antes descritos, junto con sus cantidades en un pool y se reparte la cantidad (50  $\mu$ L o 25  $\mu$ L) por tubo de PCR. Hay que hacer notar que un ensayo de PCR es un ensayo con doble control, uno positivo para el gen o fragmento de ADN buscado y otro negativo para evitar contaminaciones. Estos tubos, con sus respectivos volúmenes se introducen en un termociclador y se inicia el programa específico para el gen o segmento de ADN buscado.

Los cebadores utilizados y las condiciones necesarias para la PCR se presentan en las siguientes tablas.

**Tabla 7** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a beta-lactámicos

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño de amplicón)
<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	96°C 5 min 1 ciclo	(Steward <i>et al.</i> , 2001) 813 pb
	96°C 1 min	
	61°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	72°C 10 min 1 ciclo	(Belaouaj <i>et al.</i> , 1994) 1.150 pb
	94°C 3 min 1 ciclo	
	94°C 1 min 60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> CACTCAAGGATGTATTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C 15 seg 1 ciclo	(Pitout <i>et al.</i> , 1998) 885 pb
	96°C 15 seg	
	52°C 15 seg 30 ciclos	
	72°C 2 min 72°C 3 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-UNIVERSAL</sub> CGATGTGCAGTACCAGTAA TTAGTGACCAGAATCAGCGG	94°C 5 min 1 ciclo	(Batchelor <i>et al.</i> , 2005) 585 pb
	94°C 30 seg	
	52°C 30 seg 35 ciclos	
	72°C 1 min 72°C 5 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-3G (grupo 1)</sub> GTTACAATGTGTGAGAAGCAG CCGTTTCCGCTATTACAAAC	94°C 7 min 1 ciclo	(Pagani <i>et al.</i> , 2003) 1.017 pb
	94°C 50 seg	
	50°C 40 seg 35 ciclos	
	68°C 1 min 68°C 5 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9 (grupo 9)</sub> GTGACAAAGAGAGTGCAACGG ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	94°C 3 min 1 ciclo	(Coque <i>et al.</i> , 2002) 857 pb
	94°C 45 seg	
	62°C 45 seg 30 ciclos	
	72°C 45 seg 72°C 10 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CTX-M-10 (grupo 10)</sub> CCGCGCTACACTTTGTGGC TTACAAACCGTTGGTGACG	94°C 3 min 1 ciclo	(Coque <i>et al.</i> , 2002) 944 pb
	94°C 45 seg	
	56°C 45 seg 35 ciclos	
	72°C 45 seg 72°C 10 min 1 ciclo	
<i>bla</i> <sub>CMY</sub> GATTCCTGGACTCTTCAG TAAAACCGTTCCCAGATAG C	95°C 3 min 1 ciclo	(Stapleton <i>et al.</i> , 1999) 1.807 pb
	95°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 30 seg 72°C 3 min 1 ciclo	

**Tabla 8** Cebadores utilizados para determinar los entornos de los genes codificantes de BLEEs y sus entonos genéticos

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>sul1-orf513</i> (ISCR1)  sul1-F: TGGTGACGGTGTTCGGCATTC orf513-D3: CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	94°C 5 min 1 ciclo	(Lartigue <i>et al.</i> , 2004)  2.120 pb
	94°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
<i>orf513</i> (ISCR1)  orf513-D5: CTTTTGCCCTAGCTGCGGT orf513-D3: CTCACGCCCTGGCAAGGTTT	94°C 5 min 1 ciclo	(Lartigue <i>et al.</i> , 2004)  594 pb
	94°C 1 min	
	56°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
<i>orf513-bla<sub>CTX-M</sub></i>  orf513-D5: CTTTTGCCCTAGCTGCGGT MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACATA	94°C 5 min 1 ciclo	(Lartigue <i>et al.</i> , 2004)  1.600 pb
	94°C 1 min	
	58°C 1 min 35 ciclos	
	72°C 1 min	
<i>bla<sub>CTX-M</sub>-orf1005</i> (IS3000)  M9rlower: GAGAATCATCGCCGAAGGG Orf1005-R: ATCCATAATAGCATCCATCAT	94°C 5 min 1 ciclo	(Eckert <i>et al.</i> , 2004)  1.729 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 3 min	
<i>orf1005</i> (IS3000)  Orf1005int-F: TGGGTATCGGTTGAGAGCACA Orf1005int-R: CAATCCAGAAGCCGTTCCCA	94°C 5 min 1 ciclo	(Briñas, 2005)  469 pb
	94°C 1 min	
	68°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>ISEcp1- bla<sub>CTX-M</sub></i>  ISEcp1U2: AATACTACCTTGCTTTCTGA MA3(CTX-M): ACYTTACTGGTRCTGCACAT <sup>a</sup>	94°C 3 min 1 ciclo	(Saladin <i>et al.</i> , 2002)  831 pb
	94°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 30 seg	
IS26- <i>bla<sub>CTX-M</sub></i>  IS26U: AGCGGTAAATCGTGGAGTGA MA3(IS26): CGCCATAACTTTACTGGTA	94°C 3 min 1 ciclo	(Briñas, 2005; Saladin <i>et al.</i> , 2002)  538 pb
	94°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 30 seg	
<i>bla<sub>CTX-M</sub> - IS903</i>  M9 IS903: CTACGGCACCACCAATGATA IS903 r5'Eckert: CATCATCCAGCCAGAAAGTT IS903 reverse: CGGTTGTAATCTGTTGTCCA	94°C 3 min 1 ciclo	(Eckert <i>et al.</i> , 2004; Vinué, 2010)  320 pb; 991 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
<i>bla<sub>CTX-M-orf477</sub></i>  M3 int upp: TCACCCAGCCTCAACCTAAG ORF1 polM3: GCSCCGACACCCCTCACACCT <sup>a</sup>	94°C 3 min 1 ciclo	(Eckert <i>et al.</i> , 2004)  450 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

<sup>a</sup>Y=C o T; R= A o G; S=C o G.

**Tabla 9** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a quinolonas

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>gyrA</i> TGTCCGAGATGGCCTGAAGC TACCGTCATAGTTATCCACG	92°C 3 min 1 ciclo	(Griggs <i>et al.</i> , 1996) 347 pb
	92°C 30 seg	
	63°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 3 min 1 ciclo	
<i>parC</i> CTATGCGATGTCAGAGCTGG TAACAGCAGCTCGGCGTATT	95°C 5 min 1 ciclo	(Griggs <i>et al.</i> , 1996) 350 pb
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 32 ciclos 72°C 1,5 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

**Tabla 10** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a tetraciclinas

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>tet(A)</i> GTAATTCTGAGCACTGTCGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	95°C 5 min 1 ciclo	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2000) 937 pb
	95°C 30 seg	
	62°C 30 seg 23 ciclos 72°C 45 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>tet(B)</i> CTCAGTATTCCAAGCCTTTG CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	95°C 5 min 1 ciclo	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2000) 416 pb
	95°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos 72°C 20 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>tet(C)</i> TCTAACAATGCGCTCATCGT GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	95°C 5 min 1 ciclo	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2000) 570 pb
	95°C 30 seg	
	62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 20 seg	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>tet(D)</i> ATTAACTGCTGGACGCGAT CTGATCAGCAGACAGATTGC	95°C 5 min 1 ciclo	(Guardabassi <i>et al.</i> , 2000) 1.104 pb
	95°C 30 seg	
	57°C 30 seg 25 ciclos 72°C 20 seg	
	72° 7 min 1 ciclo	

**Tabla 11** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a cloranfenicol

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>cmlA</i> TGTCATTTACGGCATACTCG ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94°C 5 min 1 ciclo	(Sáenz <i>et al.</i> , 2004) 455 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>floR</i> CACGTTGAGCCTCTATAT ATGCAGAAGTAGAACGCG	94°C 5 min 1 ciclo	(Ng <i>et al.</i> , 1999) 868 pb
	94°C 30 seg	
	55°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

**Tabla 12** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a sulfonamidas

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>sul1</i> TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C 5 min 1 ciclo	(Mazel <i>et al.</i> , 2000) 789 pb
	94°C 30 seg	
	63°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>sul2</i> CGGCATCGTCAACATAACC GTGTGCGGATGAAGTCAG	94°C 5 min 1 ciclo	(Maynard <i>et al.</i> , 2003) 722pb
	94°C 30 seg	
	50°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1,5 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>sul3</i> GAGCAAGATTTTGGAAATCG CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	94°C 5 min 1 ciclo	(Perreten and Boerlin, 2003) (792 pb)
	94°C 1 min	
	51°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

**Tabla 13** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a los aminoglucósidos

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>aac(3)-I</i> (resistencia a GEN) ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	94°C 5 min 1 ciclo	(van de Klundert and Vliegenthart, 1993) 169 pb
	94°C 30 seg	
	60°C 45 seg 32 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>aac(3)-II</i> (resistencia a GEN) ACTGTGATGGGATACGCGTC CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94°C 5 min 1 ciclo	(van de Klundert and Vliegenthart, 1993) 237 pb
	94°C 30 seg	
	60°C 45 seg 32 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>aac(3)-IV</i> (resistencia a GEN) CTTCAGGATGGCAAGTTGGT TCATCTCGTTCTCCGCTCAT	94°C 5 min 1 ciclo	(van de Klundert and Vliegenthart, 1993) 286 pb
	94°C 30 seg	
	60°C 45 seg 32 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>aph(3')-Ia</i> (resistencia a KAN) ATGGGCTCGGATAATGTC CTCACCGAGGCAGTTCCAT	94°C 5 min 1 ciclo	(Maynard <i>et al.</i> , 2003) 600 pb
	94°C 30 seg	
	50°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 1,5 min	
<i>aph(3')-IIa</i> (resistencia a KAN) GAACAAGATGGATTGCACGC GCTCTTCAGCAATATCACGG	94°C 5 min 1 ciclo	(Maynard <i>et al.</i> , 2003) 680 pb
	94°C 30 seg	
	50°C 30 seg 30 ciclos	
	72°C 1,5 min	
<i>aac(6')-Ib</i> (resistencia a TOB, KAN y AMK) TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT * CGTCACTCCATACATTGCAA	94°C 5 min 1 ciclo	(Park <i>et al.</i> , 2006) 500 pb
	94°C 45 seg	
	55°C 45 seg 34 ciclos	
	72°C 45 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	

Cebadores (secuencia 5'→3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>aadA</i> (1 o 2) (resistencia a STR) GCAGCGCAATGACATTCTTG ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C 5 min 1 ciclo	(Madsen <i>et al.</i> , 2000) 282pb
	94°C 1 min	
	60°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>aadA5</i> (resistencia a STR) CTTCAAGTTCGGTGAGTGGC CAATCGTTGCTTTGGCATAT	95°C 5 min 1 ciclo	(Wei <i>et al.</i> , 2009) 453pb
	95°C 1 min	
	55°C 1 min 35 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 10 min 1 ciclo	

\*Cebador utilizado para secuenciar el amplicón obtenido.

**Tabla 14** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con la resistencia a trimetoprim

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
cebadores DfrIa (dfrA1, dfrA5, dfrA15, dfrA15b, dfrA16, dfrA16b) GTGAAACTATCACTAATGG TTAACCCTTTTGCCAGATTT	94°C 5 min 1 ciclo	(Navia <i>et al.</i> , 2003) 474 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 7min 1 ciclo	
cebadores DfrVII (dfrA7, dfrA17) TTGAAAATTTTCATTGATT TTAGCCTTTTTTCCAAATCT	94°C 5 min 1 ciclo	(Navia <i>et al.</i> , 2003) 474 pb
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
cebadores DfrXII (dfrA12, dfrA13) GGTGSGCAGAAGATTTTTTCGC <sup>a</sup> TGGGAAGAAGGCGTCACCCTC	94°C 5 min 1 ciclo	(Navia <i>et al.</i> , 2003) 319 pb
	94°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	

<sup>a</sup>Y=C o T; R= A o G; S=C o G.

### 3.8.1 CARACTERIZACIÓN DE INTEGRONES Y DE SUS REGIONES VARIABLES.

En este caso, la PCR se prepara exactamente igual que se ha descrito en el [apartado 3.8](#) pero el volumen siempre es de 50  $\mu$ L puesto que se realiza la secuenciación de los productos obtenidos.

**Tabla 15** Cebadores empleados y condiciones de amplificación de PCR de los genes relacionados con integrasas y para el estudio de las regiones variables de los integrones

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>intI1</i> (integrasa clase 1) GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C 5 min 1 ciclo	(Mazel <i>et al.</i> , 2000) 483 pb
	94°C 30 seg	
	62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
Región variable de integrón clase 1 GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	94°C 5 min 1 ciclo	(Levesque and Roy, 1993) variable
	94°C 1 min	
	55°C 1 min 35 ciclos 65°C 8 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>qacEA1 + sulI</i> GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C 5 min 1 ciclo	(Sáenz, 2004) 1.125 pb
	94°C 30 seg	
	63°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
<i>intI2</i> (integrasa clase 2) CACGGATATGCGACAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C 5 min 1 ciclo	(Mazel <i>et al.</i> , 2000) 788 pb
	94°C 30 seg	
	62°C 30 seg 30 ciclos 72°C 1 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	
Región variable de integrón clase 2 CGGGATCCCGACGGCATGCACGATTTGTA GATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C 5 min 1 ciclo	(White <i>et al.</i> , 2001) variable
	94°C 1 min	
	60°C 1 min 35 ciclos 72°C 6 min	
	72°C 8 min 1 ciclo	

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño amplicón)
<i>intI3</i> (integrasa clase 3) GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG ACGGATCTGCCAAACCTGACT	94°C	5 min	1 ciclo	(Mazel <i>et al.</i> , 2000) (979 pb)
	94°C	30 seg		
	62°C	30 seg	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	8 min	1 ciclo	

### 3.8.2 SISTEMA PCR WALKING-PRIMER

El estudio de integrones requirió en algunos casos una estrategia de "PCR walking-primer", combinando distintos cebadores para amplificar y secuenciar de manera solapante y lo más completo posible el integrón.

El caso en el que se realizó esta estrategia fue en los integrones de clase 1 defectivos, la elección de los distintos cebadores dependió del fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos del aislado, ampliando desde el protocolo inicial estipulado para integrones de clase 1 empleando cebadores de las tablas anteriores (tabla 11-tabla 15) o nuevos diseños en base a descripciones previas de la bibliografía como los siguientes (Vinué, 2010):

*intI-centro*: CGAAATCCAGATCCTTGACCC (se une en el gen *intI1*).

*sat-R*: GAACCACGAATCGCATCTTT (se une en el gen que codifica una esterasa *estX*).

*psp-R*: ATATGTCGCCAGGTCGTAGC (se une en el gen que codifica una fosfoserina fosfatasa *psp*).

*aad-rev*: CAAGAATGTCATTGCGCTGC (se une en el gen *aadA* que confiere resistencia a estreptomicina).

*qacH*-(F/R): TGAAGAACTGGCTCTTTCTGG/ CGCTGACCTTGGATAGCAG (amplifica el gen *qacH*, implicado en la resistencia a amonio cuaternario).

### 3.9 ESTUDIO DEL PERFIL PLASMÍDICO

Para identificar una cantidad determinada de grupos de incompatibilidad de plásmidos, se realiza una prueba de PCR con un conjunto de cebadores organizados en tandas de PCRs multiplex y simples.

**Tabla 16** Reactivos y condiciones de PCR para realizar la técnica de estudio de plásmidos PBRT (Carattoli et al., 2005a)

Componentes (distribuidor)	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Cebador “forward” (Sigma Aldrich)	50 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Cebador “reverse” (Sigma Aldrich)	50 $\mu$ M	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
BIOTAQ <sup>1M</sup> DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	1,25U
Tampón de reacción NH4 (Bioline)	10 X	2,5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> (Bioline)	50 mM	0,75 $\mu$ L	1,5 mM
dNTPs (Bioline)	10 mM	0,5 $\mu$ L	0,2 mM
ADN	---	5 $\mu$ L	---
Agua miliQ estéril	---	Hasta 25 $\mu$ L	---

Con estos ensayos, la PCR se prepara exactamente igual que se ha descrito en el [apartado 3.8](#) pero el volumen siempre es de 25  $\mu$ L.

**Tabla 17** Cebadores utilizados en PBRT para el estudio de plásmidos y condiciones de amplificación (Carattoli et al., 2005a)

Tipo de replicón	Cebadores (5'-3')	Tamaño amplicón
H1 <sup>a</sup>	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAG	471 pb
H2 <sup>a</sup>	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCTT	644 pb
I1 <sup>a</sup>	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139 pb
X <sup>b</sup>	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376 pb
L/M <sup>b</sup>	F: GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785 pb
N <sup>b</sup>	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559 pb
W <sup>c</sup>	F: CCTAAGAACAACAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242 pb
FIA <sup>c</sup>	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTCCGCAG	462 pb
FIB <sup>c</sup>	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCGTCGCTTCAGGGCATT	702 pb

Tipo de replicón	Cebadores (5'-3')	Tamaño amplicón
Y <sup>d</sup>	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765 pb
P <sup>d</sup>	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534 pb
FIC <sup>d</sup>	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262 pb
FII <sup>s</sup> <sup>e</sup>	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC R: CTCTGCCACAACTTCAGC	270 pb
A/C <sup>e</sup>	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465 pb
T <sup>e</sup>	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750 pb
F <sub>repB</sub> <sup>f</sup>	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270 pb
K	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCCGCCAAA	160 pb
B/O	F: GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159 pb

<sup>a</sup>Multiplex 1; <sup>b</sup>Multiplex 2; <sup>c</sup>Multiplex 3; <sup>d</sup>Multiplex 4; <sup>e</sup>Multiplex 5; Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 1 min; 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y elongación final (72°C, 5 min). <sup>f</sup> La temperatura de hibridación para esta PCR fue de 52°C.

### 3.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para determinar si las diferentes pruebas de PCR realizadas en los diferentes ensayos eran positivas se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Dependiendo de los tamaños de los amplicones esperados, la concentración de agarosa utilizada fue diferente (cuanto más pequeños los fragmentos, más concentración de agarosa).

Se prepara 100 mL de una solución de agarosa D1 Low EEO (Pronadisa, CONDA) a la concentración requerida, normalmente al 1 % para fragmentos entre 300 y 1.200 pares de bases, en buffer TBE 1X, a partir de un Stock al 5X (20 mL de Buffer (54 g/L Tris(hidroximetil)aminometano; 27,5 g/L ácido bórico; 20 mL EDTA 0,5 M, pH 8.) y 80 mL de agua destilada). Se calienta hasta ebullición y se deja reposar antes de añadir en intercalador molecular que servirá después como detector de hebras de ADN de doble cadena. En este estudio se han utilizado dos: Bromuro de Etidio (BioRad) y Midori Green advanced DNA stain (Nippon genetics europe gmbH, Düren

Germany). La cantidad que se añade a la agarosa líquida, tras enfriarse, es de 2µL/100mL de agarosa por parte del Bromuro de Etidio y 5 µL /100 mL por parte de Midori Green. Esta esta mezcla se vierte en el molde preparado previamente con un peine para generar los pocillos.

Una vez solidificada la agarosa se retira con cuidado el peine y de este modo obtenemos los pocillos donde se cargará la muestra de producto de PCR. Para cargar la muestra, se hace necesario darle más densidad que la del buffer donde se va a realizar la electroforesis, así que una alícuota de 10 µl de producto de PCR se mezcla con 2µL de Azul de Carga (10 % (m/v) sacarosa, 0,0025 % (m/v) azul de bromofenol, 0,0025 % (m/v) xileno cianol) y todo se deposita en el interior del pocillo del gel. Además de las muestras, es necesario cargar un marcador de tamaño, el cual también dependerá del tamaño del amplicón esperado.

Una vez posicionado el gel en el interior de la cubeta de electroforesis, sumergido en buffer TBE 1X y con los pocillos cercanos al electrodo negativo. Dependiendo de la resolución buscada y de la concentración de agarosa del gel, se comienza la electroforesis con corriente continua, a un voltaje entre 65 y 96 V, y un tiempo de 45 min a más de 1h y 30 min.

Pasado este tiempo, se retira el molde de la cubeta de electroforesis y el gel se introduce en la cámara oscura (Image Store 5000 UVP) equipada con luz ultravioleta conectada a un ordenador y con el software adecuado para la captación de imágenes.

### 3.11 SECUENCIACIÓN DE AMPLICONES OBTENIDOS MEDIANTE PCR

La secuenciación de los amplificadores de PCR (genes codificantes de BLEEs, entornos genéticos, regiones variables de integrones y alelos de la técnica de MLST) se llevó a cabo por la empresa Cogenics (United Kingdom), la cual utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems). En la mayor parte de los casos la secuenciación se realizó en ambos sentidos.

### 3.12 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Las estrategias de purificación, en los casos que fueron necesarios hacer previamente el envío para su secuenciación, fueron o bien directamente del producto de PCR, o bien a partir del gel de agarosa.

Si las impurezas se localizaban en el gel bastante separadas de la banda objetivo, el protocolo seguido era la purificación del producto directamente y se realizó siguiendo el protocolo del kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Tras la purificación se visualizaron 5  $\mu$ L del producto de PCR purificado en geles de agarosa, para comprobar si existía la concentración adecuada.

En los casos en los que se observaba las impurezas cercanas a la banda objetivo, o en el caso de regiones variables, se identificaban varias bandas de interés y no era posible obtener mediante estrategias de PCR, entonces se necesitaba purificar el producto de PCR a partir del gel de agarosa. Se purificó la muestra mediante el kit QIAquick GEL Extraction (Qiagen). Para la purificación se cargó todo el volumen del amplificado y se recortó el gel intentando ajustarse al máximo a la banda para evitar el exceso de agarosa. Tras el proceso de purificación, 5  $\mu$ L del producto de PCR purificado se visualizaron en geles de agarosa, para comprobar si existía la concentración adecuada y si se había obtenido una única banda.

### 3.13 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El análisis de las secuencias obtenidas tras la secuenciación se trabajaron y analizaron mediante herramientas on-line.

Los datos en bruto eran necesario tratarlos previamente con una herramienta de formato (<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>) y otra herramienta para obtener secuencias consenso a partir de las secuencias en ambos sentidos de los amplificados (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Una vez obtenida una secuencia consenso, se pudieron aplicar las diferentes herramientas, según el amplificado a estudiar. En el caso de identificar las variantes de BLEEs, se realizaron comparaciones con las secuencias tipo más frecuentes descritas en la página dispuesta por la Clínica Lahey (<http://www.lahey.org/studies/>) y la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En el caso de necesitar realizar un estudio de la cadena aminoacídica generada a partir de la secuencia de ADN, se utilizó un programa

informático proporcionado por el Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>). Todas las secuencias de ADN o genes en los que no se tiene una secuencia tipo para comparar o las posibilidades son altas, la secuencia consenso se aplica directamente BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de la página National Center for Biotechnology Information (NCBI) Por último, el análisis de las secuencias de los alelos, las secuencias tipo y los complejos clonales se realizaron con la base de datos MLST Database de la Universidad de College Cork (Irlanda) (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>).

### 3.14 TIPADO MOLECULAR DE LAS CEPAS Y ESTUDIO DE RELACIÓN CLONAL

El tipado molecular de los aislados de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> se realizó a través de las siguientes técnicas:

#### 3.14.1 ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

El protocolo es una modificación del previamente propuesto por Tenover (Tenover *et al.*, 1995), en base a las especificaciones de Pulsenet Internacional (<http://www.pulsenetinternational.org/Pages/default.aspx>) A partir de un cultivo de 24 horas del microorganismo, se toma una colonia aislada y se siembra en una nueva placa de BHI-agar sólido en masa para tener una cantidad adecuada de aislado. A continuación se procede a la preparación de los insertos (plugs).

##### Insertos.

Son un rectángulo de agarosa sólida donde queda embebido el aislado y que posteriormente serán tratados para realizar la electroforesis. Es importante que la bacteria esté a una concentración determinada para que la proteasa y la enzima de restricción actúen adecuadamente en pasos posteriores. Los siguientes pasos se realizan a todos los aislados.

1.- Se preparan tantos tubos falcon-15 como aislados se tengan en una gradilla y se llenan con 3 mL de Buffer SE (100 mL volumen final. Composición: 75 mM de NaCl; 25 mM EDTA ph8).

## Material y métodos

2.- Se suspende una cantidad de cepa fresca en 3mL de Buffer SE y se mide la absorbancia de esa suspensión en un espectrómetro a 630 nm. El valor ideal es 1,4, estando los rangos recomendados entre 1,3 y 1,5. Si la medida no está en rango, se añade más aislado o se diluye. Cuando se tienen las disoluciones en la concentración deseada, se toman 500  $\mu$ L y se traspasan a eppendorfs correctamente rotulados.

3.- Se prepara un erlenmeyer con agarosa para insertos a una concentración de 1,5 % m/v disuelto en buffer TE (1 L volumen final. Composición 10 mM Tris; 1 mM EDTA pH8. A este buffer se le puede añadir tiourea (0,01 g/L)). Para calcular la cantidad de agarosa que se debe preparar, se necesitan 500  $\mu$ L por aislado. Una vez que se tiene disuelta la agarosa, se atempera en un baño a unos 52° C.

4.- Se preparan los moldes para los insertos. Es aconsejable anotar en un papel previamente el orden de carga ya que por aislado se generan cuatro insertos.

5.- Una vez que todo está preparado, se toman 500  $\mu$ L de agarosa líquida a 52° C y se mezclan suavemente con los 500  $\mu$ L de suspensión de bacteria, seguidamente se toman 500  $\mu$ L de esa mezcla y se rellenan 4 pocillos de los moldes y se deja enfriar hasta que solidifique. Así se procede con todas las muestras.

6.- Cuando ya están completamente sólidos los insertos, se desmoldan y se introducen en tubos falcon-15. Cada falcon-15 contendrá 4 insertos.

7.- En este paso se busca eliminar la pared y membrana de la bacteria. El buffer de lisis se termina de preparar añadiendo la proteinasa K (Sigma-Aldrich) y cuando esté disuelta, a cada falcon-15 con sus insertos dentro, se le añade 3 mL de buffer de lisis terminado y se deja en agitación a 54° C durante 2 horas (como mínimo, no abusar del tiempo por encima de 2 horas).

8.- Después del tiempo de digestión, es necesario realizar una serie de lavados para eliminar los restos de pared y membranas que posteriormente podrían interferir en la digestión del ADN. Para ello se realizan 3 lavados consecutivos con agua MiliQ y después dos con buffer TE. Los lavados consisten en añadir 10 mL de agua o de buffer al tubo falcon-15, después agitar durante 10 minutos a 54° C y tras los 10 minutos eliminar la solución del falcon 15 sin perder insertos. El último lavado con buffer TE se realiza a temperatura ambiente.

9.- Tras el último lavado, los insertos pueden quedarse almacenado en TE a 4° C durante un tiempo indeterminado.

#### Electroforesis.

10.-En el momento que se decida realizar el gel de PFGE, lo primero que se hace es tomar un inserto y cortar un rectángulo de 2 mm de ancho y se introduce en un eppendorf correctamente rotulado. Esto se hace con todas las cepas que se vayan a utilizar en el gel (máximo 18). En ambos extremos se mete un marcador de tamaño.

11.- Se prepara aparte un pool con todos los reactivos necesarios para preparar la enzima *XbaI* (New England Labs; TAKARA Labs) (2 µL de enzima (20 U/µL) o 2,6 µl de enzima (15 U/µL), 1 µl BSA, 10 µL de Buffer de enzima y 87 u 86,4 µL de agua miliQ por muestra) y se añade 100 µL en cada eppendorf con su inserto dentro.

12.- Se dejan todos durante 6 horas (como mínimo) a 37° C

13.- Tras este tiempo, se calibra y limpia el CHEFF con 2 litros de agua y se prepara un gel de agarosa D5 al 1 % m/v con TBE 0,5X. Este gel se prepara SIN Bromuro de Etidio. Una vez solidificado, se introducen los insertos en los pocillos y se sellan con agarosa.

14.- El CHEFF se llena con buffer de electroforesis TBE 0,5x (2 litros) y 0,01 g de tiourea en el buffer, se introduce y se fija el gel en el centro y se realiza la electroforesis con los siguientes parámetros: 6 V/cm, una rampa pulsada de 1 s a 30 s, 23 horas. La temperatura debe ser constante a 14° C y una fuerza de bombeo de 70.

#### Tinción y revelado.

15.- Tras las 23 h, se retira del CHEFF y se tiñe por inmersión con bromuro de etidio (10 µL/200 ml de Agua) durante 20 minutos. Se realiza un primer visionado del gel y si todo es correcto, se va destiñendo con lavados con agua y agitación aumentando el tiempo.

### 3.14.2 GRUPOS FILOGENÉTICOS

Se puede realizar un tipado de los aislados de *E. coli* mediante la determinación de su grupo filogenético. Hay 5 grupos mayoritarios y su determinación se basa en la presencia o ausencia (determinada por PCR) de dos genes y una secuencia intergénica, todos ellos localizados en el cromosoma bacteriano. La técnica ha sido descrita por Clermont *et al.* 2000, pero la clasificación y nomenclatura de los grupos fue posterior (Branger *et al.*, 2005).

La PCR se realiza exactamente igual como se ha descrito en el [apartado 3.8](#) (volumen final de 25 µL).

**Tabla 18** Cebadores necesarios para la identificación de los grupos filogenéticos

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia(Tamaño amplicón)
<i>chuA</i> F:GACGAACCAACGGTCAGGAT R:TGCCGCCAGTACCAAAGACA		(Clermont <i>et al.</i> , 2000) 279 pb
<i>yjaA</i> F:TGAAGTGTCAGGAGACGCTG R:ATGGAGAATGCGTTCCTCAA C	94°C 5min.      1 ciclo 94°C 30seg. 55°C 30seg.      30 ciclos 72°C 30seg. 72°C 7min.      1 ciclo	(Clermont <i>et al.</i> , 2000) 211 pb
TSPE4.C2 F:GAGTAATGTCGGGGCATTCA R:CGCGCCAACAAAGTATTACG		(Clermont <i>et al.</i> , 2000) 152pb

La definición de los grupos quedaría del siguiente modo: (*chuA/yjaA/TSPE4.C2*): grupo filogenético A (-/+/-); grupo filogenético A0 (-/-/-); grupo filogenético B1 (-/-/+); grupo filogenético B2 (+/+/+ o -); grupo filogenético D (+/-/+ o -).

### 3.14.3 MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

La técnica se basa en la determinación de la secuencia de 7 genes intrínsecos de *E. coli* que son amplificados por PCR y posteriormente secuenciados. A partir de la combinación alélicas de dichos genes, se obtiene la secuencia tipo (ST) y el complejo clonal (SCC). En la tabla 19 se indican los genes cromosómicos que se amplifican por PCR y las condiciones de la técnica. Los genes housekeeping incluidos en el sistema de tipado de *E. coli* son los siguientes: *adhA* (codifica una adenin kinasa), *fumC* (codifica una fumarato hidratasa), *icd* (codifica una isocitrato/isopropilmalato dehidrogenasa), *purA* (codifica una adenilosuccinato dehidrogenasa), *gyrB* (codifica una ADN girasa), *mdh* (codifica una malato dehidrogenasa) y *recA* (es un motivo de unión de ATP/GTP).

**Tabla 19** Cebadores y condiciones necesarias para realizar la amplificación de los 7 genes del tipado por MLST de las cepas de *E. coli*

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>adhA</i> F: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG R: CCGTCAACTTTCGCGTATTT	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 583 pb
	95°C 1 min	
	54°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>fumC</i> F: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC R: GTACGCAGCGAAAAAGATTC	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 806 pb
	95°C 1 min	
	54°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>icd</i> F: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGT TCCGGCACA R: GGACGCAGCAGGATCTGTT	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 878 pb
	95°C 1 min	
	54°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 2 min 1 ciclo	

Cebadores (secuencia 5'-3')	Condiciones de amplificación	Referencia (Tamaño amplicón)
<i>purA</i> F: CGCGCTGATGAAAGAGATGA R: CATACGGTAAGCCACGCAGA	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 816 pb
	95°C 1 min	
	54°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>gyrB</i> F: TCGGCGACACGGATGACGGC R: ATCAGGCCTTCACGCGCATC	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 880 pb
	95°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>mdh</i> F: ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTG CTGGCGG R: TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGA TATCTTTCTT	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 734 pb
	95°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
<i>recA</i> F: CGCATTCGCTTTACCCTGACC R: TCGTGCAAATCTACGGACCGGA	95°C 3 min 1 ciclo	(Tartof <i>et al.</i> , 2005) 932 pb
	95°C 1 min	
	60°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 2 min 1 ciclo	

### 3.15 ANÁLISIS DE GELES DE CAMPOS DE PULSOS (PFGE)

El estudio del patrón de corte por la enzima *XbaI* en los diferentes aislados se estudió utilizando el programa informático (BioCompare 2.0) para determinar similitudes y generar árboles filogenéticos, todos ellos utilizando el índice de Dice para la generación de la matriz de similitudes y UPGMA para generar los diferentes árboles.

### 3.16 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE MLST

Una vez identificados las secuencias tipo (ST) a la que pertenece cada aislado, se utilizó el programa informático PHYLOViZ (Francisco *et al.*, 2012) para estudiar la relación entre STs y la inclusión de los diferentes STs en agrupaciones mayores como Subcomplejos Clonales y Complejos Clonales.

Este programa proporciona un gráfico de esferas (nodos) que relaciona los STs entre ellos según los cambios de alelos mediante líneas y además se pueden añadir datos epidemiológicos o ambientales como la presencia de BLEE en la cepa con el correspondiente ST, origen, grupo filogenético... que representa en forma de colores en el interior de la esfera.

Se pueden realizar dos tipos de gráficos:

- 1) **Esquema goeBURST de 3 niveles.** Este sistema evalúa las relaciones directas, teniendo en cuenta los cambios de hasta tres alelos como máximo directos, cambios en las mismas posiciones (líneas negras, azules y verdes) y desempates (mismo número de cambios pero en diferentes posiciones) entre las diferencias (líneas grises y grises claras) aplicando unas reglas definidas (SLV: un cambio de alelo, DLV: dos cambios de alelo o TLV: tres cambios de alelo). Otra capacidad que presenta el programa y el esquema es la identificación de nodos principales, posiblemente originarios de Complejos Clonales (SCCs), de color verde y nodos secundarios, de color azul grisáceo (o gris). Los nodos principales, dependiendo si el verde es claro u oscuro, se puede definir como nodo principal o subnodo principal. Todos los STs que presentan más de tres diferencias se observan en el esquema como nodos principales independientes, definidos como singletons.
- 2) **Esquema Full goeBURST:** Este segundo esquema tiene en cuenta todas las diferencias, de forma que aún mediante uniones de color negro si son directas o de diferentes tonos grises si son indirectas tras la aplicación de reglas para desempate (SLV, DLV o TLV). Este esquema mantiene los colores de los nodos en relación con el anterior y se puede definir el nivel de diferencias que se quieren presentar. En nuestro caso se ha decidido presentar uniones que muestren hasta 6 diferencias, de forma que los nodos independientes son aquellos que presentan los 7 loci diferentes.

### 3.17 CREACIÓN Y ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS DE ADN DE MLST

Para poder estudiar la relación filogenética y evolutiva de las diferentes cepas según sus MLSTs, se realizó de la siguiente forma: con un editor de texto sin formato se prepararon las secuencias de los diferentes alelos que dan lugar a la secuencia tipo, el orden de las secuencias ha sido el mismo que se necesita para identificar un ST. Posteriormente se realizó la edición de las secuencias y el alineamiento mediante el algoritmo Muscle utilizando el programa CLC Sequence viewer 6.8.2. Una vez conseguido un archivo con el alineamiento, se aplicó una serie de algoritmos para identificar cuál es el modelo más acertado para la creación del árbol filogenético aplicando métodos de Máxima Verosimilitud, el programas utilizado fue jModelTest. El resultado obtenido con jModelTest dio la aplicación del modelo de Tiempo General Reversible (Nei and Kumar, 2000). El programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) fue utilizado para realizar el árbol filogenético aplicando el método y modelo acorde con las secuencias y aplicando una búsqueda Heurística mediante Máxima Parsimonia para localizar el mejor árbol filogenético que permitiese representar las secuencias de los 7 genes del MLST. El árbol con el valor de máxima verosimilitud (-7875.1730) es el mostrado. Una distribución estadística Gamma fue aplicada por el programa MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>) como modelo evolutivo para evaluar las diferencias entre posiciones (5 categorías (+G, parámetro=0,1000)). El modelo de variación de rangos permitió que algunas posiciones se considerasen invariables evolutivamente ([+I], 84.3598% posiciones). El árbol ha sido dibujado a escala, con la longitud de las ramas medida en sustituciones por sitio El análisis se ha realizado con las 39 secuencias tipo diferentes encontradas en los aislados de esta tesis.

### 3.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

El estudio estadístico de los datos se realizó con el paquete informático SPSS.

Las escalas de medidas que se han aplicado a las diferentes variables son: nominales, ordinales y de escala. Estas últimas se han formado agrupando numéricamente categorías.

En cuanto a la clasificación de las variables, según los fenómenos evaluados son todas orgánicas (variables referidas a la biología y fisiología de los elementos estudiados), en cuanto al proceso experimental tenemos variables independientes (antibióticos beta-lactámicos, otros antibióticos, origen de las cepas) y variables

dependientes (algunos antibióticos, variantes de beta-lactamasas, tipos de rep de pánsmidos, grupos filogenéticos y integrones), y en cuanto a las características matemáticas de las mismas, la mayoría son cualitativas y las variables agrupadas son cuantitativas merísticas.

Las hipótesis contrastadas se han inferido a partir de la observación de los resultados

### 3.18.1 POBLACIÓN/MUESTRA

El estudio estadístico se ha realizado sobre una muestra de cepas obtenidas de diferentes orígenes aplicando el criterio de **presentar resistencia al antibiótico cefotaxima y presentar una enzima BLEE.**

Dependiendo del origen, el muestreo ha tenido diferentes niveles. En cuanto a los seres humanos, las muestras fecales de pacientes han sido obtenidas de acuerdo a un periodo de tiempo, las muestras fecales de personas sanas se han realizado mediante voluntariedad del sujeto. Se ha dispuesto de un tamaño muestral de más de 100 individuos para garantizar la obtención de resultados con los niveles de error alfa y beta comunes en estos estudios. Las muestras fecales de los perros fueron tomadas en la perrera municipal y destinados a eutanasia, a lo largo de un periodo y buscando un tamaño muestral alto (más de 100 individuos).

En cuanto a las muestras de alimentos, la campaña de muestreo se realizó prácticamente por los mismos sujetos a lo largo de un periodo, los cuales aportaban diferentes muestras cárnicas obtenidas de diferentes carnicerías y centros comerciales de la ciudad de Logroño. El tamaño muestral fue también alto, (por encima de las 100 muestras) y además en este caso se pudo dar la posibilidad de realizar el mismo tipo de muestreo en otro periodo de tiempo.

Tras este primer nivel de muestreo, el segundo ya se dio en laboratorio y fue a partir de un medio selectivo donde fueron sembradas todas las muestras obtenidas. Y se dio un muestreo doble: se descartaron muestras que no presentaban *E. coli* resistente al antibiótico selectivo, y de las muestras donde se detectó crecimiento, de la única placa sembrada, se tomaron aleatoriamente dos aislados diferentes. Posteriormente, tras la prueba de antibiograma, si presentaban el mismo perfil, uno de los dos aislados se descartaba.

### 3.18.2 DISEÑO Y VARIABLES

Los aislados obtenidos se han agrupado por origen y periodo de muestreo. Las cepas de seres humanos, ambas se han agrupado en Pacientes y Sanos, tomando los periodos de tiempo como únicos. Las cepas de Perros se incluyeron en un mismo bloque. Las cepas de Alimentos se pueden dividir en dos grupos, según los periodos de muestreo.

Como se ha comentado en Material y Métodos, las cepas se han agrupado en función de sus orígenes y se han considerado cada carácter estudiado como una variable nominal u ordinal (CTX, CAZ, ATM, AMC, IMP, AM, GEN, TOB, KAN, STR, CLO, TET, SUL, SXT, NAL, CIP, A0, A, B1, B2, D, paciente, perros, individuos sanos, CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-14a, CTX-M-14b, SHV-12, TEM-52, IntT1, IntT2, I1, HI2, HI1, X, LM, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, AC, FIIs, T, FII, BO, K). Posteriormente se han agrupado en variables categóricas de rango: Origen agrupado (Origen), Grupo Filogenético (GF), Grupos de beta-lactamasas (BLEE), Tipos de BLEE. Además, se crearon variables cuantitativas merísticas donde se resumen el número de aminoglucósidos resistentes por cepa (FamAG), o de fluoroquinolonas (FamFQ), sulfamidas y sulfametoxazol (FamSul), tetraciclinas (FamTet), cloranfenicol (FamC) y cantidad de replicones de plásmidos por cepa (Nrep).

Partiendo que las variables Anibióticos beta-lactámicos (FamBL), BLEE y Origen son variables independientes por definición, ya que el estudio incide directamente en ellas, interesa conocer si el resto de variables son dependientes o independientes de las mismas (AMK, GEN, TOB, KAN, STR, FamAG, CLO, FamC, TET, FamTet, SUL, SXT, FamSul, NAL, CIP, FamFQ, GF, A0, A, B1, B2, D, IntT1, IntT2, Tint, I1, HI2, HI1, X, LM, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, AC, FIIs, T, FII, BO, K, Nrep).

### 3.18.3 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

#### 3.18.3.1 NORMALIDAD

Para determinar si estas variables se comportan de acuerdo a una distribución Normal, información importante para determinar qué tipo de pruebas se deberán aplicar posteriormente, se requiere realizar un Test de Normalidad para variables cualitativas.

El test aplicado es el del **Índice Kormogonov-Smirnov** con un p-value de 0,05. Las hipótesis son:

Ho: La variable independiente se ajusta a una distribución Normal.

H1: La variable independiente NO se ajusta a una distribución Normal.

### 3.18.3.2 INDEPENDENCIA

Para ello se han evaluado todas estas variables en cuanto a independencia mediante **la Prueba de  $\chi^2$  de independencia**, asumiendo una probabilidad de significancia estadística del 5 % (p-value=0,05).

La formulación de la hipótesis es como sigue:

Ho: La presencia de la variable es independiente del origen de las cepas.

H1: La presencia de la variable NO es independiente del origen de las cepas.

### 3.18.3.3 COMPARACIÓN DE VARIANZAS

Una vez que se conoce la independencia de las variables, es importante saber si el error de la varianza es constante o no, es decir, si las variaciones que se pueden dar en la varianza pueden darse por influencia de otras variables o no. Para ello se han estudiado las variables en función del origen de las muestras, utilizando como estadístico la **Prueba de Levene** para las variables no paramétricas

La hipótesis general planteada para esta prueba es la siguiente:

Ho: Las varianzas de los dos grupos contrastada con la variable son iguales.

H1: Las varianzas de los dos grupos contrastada con la variable NO son iguales.

### 3.18.4 CONTRASTE DE HIPÓTESIS

Tras comprobar la dependencia y comparación de varianzas, el siguiente paso consiste en contrastar diferentes hipótesis partiendo de las observaciones obtenidas.

Para el contraste de hipótesis entre variables independientes se aplicarán las tablas de contingencia y se asumirá para todas las pruebas un p-value=0,05. Dependiendo de la cantidad de muestras y de las frecuencias esperadas de las variables, los estadísticos utilizados serán mediante **la Prueba de  $\chi^2$  de Pearson** (frecuencia esperada mayor de 5), **el Estadístico de Yates (Corrección por continuidad)**

(frecuencia esperada entre 3 y 5) o la **Prueba exacta de Fisher** (frecuencia esperada menor de 5).

La hipótesis general planteada para esta prueba es la siguiente:

Ho: La situación X no está relacionada con la situación Y.

H1: La situación X SI está relacionado con la situación Y.

#### 3.18.4.1 COMPARCIÓN DE POBLACIONES

Para determinar si existen diferencias para una variable X entre las cepas obtenidas de humanos o de animales, se aplica la prueba no paramétrica U de Mann Whitney.

Con ella y el estadístico obtenido podemos saber si una variable se presenta de forma diferenciada en dos poblaciones, con una significancia del 5 %, es decir, definiendo un p-value = 0,05.

La hipótesis general planteada para esta prueba es la siguiente:

Ho: La variable o factor X no es distinto entre humanos y animales.

H1: La variable o factor X SI es distinto entre humanos y animales.

#### 3.19 MEDIO DE CONSERVACIÓN

Es un medio preparado para conservar durante largos periodos de tiempo las cepas aisladas de las muestras. Se utilizó el medio comercial Skim milk (Becton Dickinson & Co) que se preparó según las recomendaciones del fabricante. Una vez preparado, se alícuota 1,5 ml por tubo, se autoclava y se guardan a 4° C antes de su utilización.

Los científicos han calculado que la probabilidad de que ocurra algo tan patéticamente absurdo es de una entre un millón. Pero los magos saben que las probabilidades de una entre un millón se cumplen nueve de cada diez veces.

**Mort**

*--Terry Pratchett*

## RESULTADOS

*“Las palabras, cera*

*Las obras, acero”*

*--Luis de Góngora*



## 4 RESULTADOS

### 4.1 CEPAS DE *E. COLI* BLEE POSITIVAS (BLEE<sup>+</sup>) OBTENIDAS DE ORIGEN HUMANO

#### 4.1.1 AISLADOS CLÍNICOS

##### 4.1.1.1 ORIGEN DE LAS CEPAS BLEE<sup>+</sup>

El fenotipo BLEE fue detectado en 72 de los 98 aislados CTX<sup>R</sup> del Hospital San Pedro que fueron analizados (73,5 %) y estas cepas BLEE<sup>+</sup> fueron caracterizadas. El 67 % de las cepas BLEE<sup>+</sup> procedían de centros de salud y el 33 % de pacientes hospitalizados. La Tabla 20 muestra el servicio de procedencia de los pacientes hospitalizados y la Tabla 21 el tipo de muestra a partir de las cuales se obtuvieron dichas cepas. Cabe destacar que en el 75 % de los casos, el origen de la muestra fue urinario.

**Tabla 20** Servicios del Hospital San Pedro en los que se encontraban los pacientes hospitalizados con aislamiento *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.

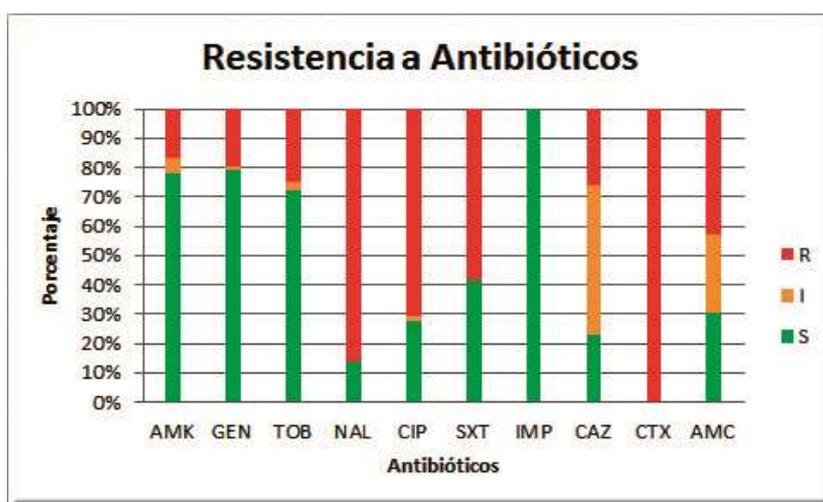
Área	nº pacientes
Urología	5
UCI	3
Ginecología	2
Nefro-crónicos	2
Unidad de corta estancia	2
Cirugía vascular	1
Digestivo	1
Lactantes	1
Medicina Interna	1
Neurología	1
Oncología	1
Pediatría	1

**Tabla 21** Tipo de muestra a partir de las cuales se aislaron las 72 cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>

Origen	nº
Orina	54
Heridas	4
Sangre	4
Broncoaspirado	1
Líquido ascítico	1
Semen	1
Espuito	1
Catéter	1
Desconocido	5

#### 4.1.1.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.

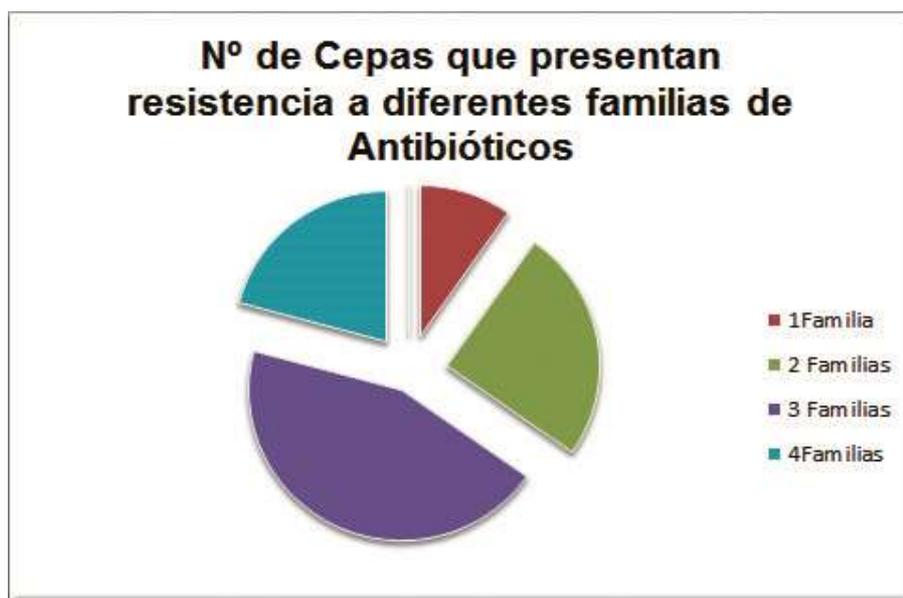
Se analizó el fenotipo de resistencia a 10 antibióticos en las 72 cepas BLEE<sup>+</sup> y el resultado se presenta en la figura 18



**Figura 18** Porcentaje de resistencia a antibióticos en las cepas clínicas BLEE<sup>+</sup> del Hospital San Pedro.

AMK: amikacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; NAL: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; IMP: imipenem; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; AMC: amoxicilina-ác. clavulánico S: sensible, I: resistencia Intermedia, R: resistente

El 65 % de las cepas presentaron un fenotipo de multirresistencia (que incluía resistencia al menos a tres familias de los antibióticos testados) (figura 19).



**Figura 19** Distribución de aislados en función del número de familias de antibióticos a las que presentaron resistencia.

#### 4.1.1.3 VARIANTES DE BLEES Y ENTORNOS GENÉTICOS

El estudio por PCR y secuenciación de los genes codificantes de BLEEs permitió su caracterización. La Tabla 22 muestra las variantes detectadas. Cabe destacar que en el 80% de las cepas se identificó una BLEE de tipo CTX-M del grupo 9 (CTX-M-14, CTX-M-9 o CTX-M-67), en el 5,6 % de las cepas una BLEE del tipo CTX-M grupo 1 (variante CTX-M-15) y en el 15,5 % una BLEE del tipo SHV-12.

Con frecuencia se detectó la presencia de beta-lactamasas tipo TEM-1 y OXA-1 en las cepas BLEE<sup>+</sup> productoras de CTX-M (Tabla 23). Asimismo, se detectó una cepa portadora de dos BLEEs diferentes (CTX-M-14+SHV12).

**Tabla 22** Variantes de BLEEs detectadas en las cepas clínicas de *E. coli*

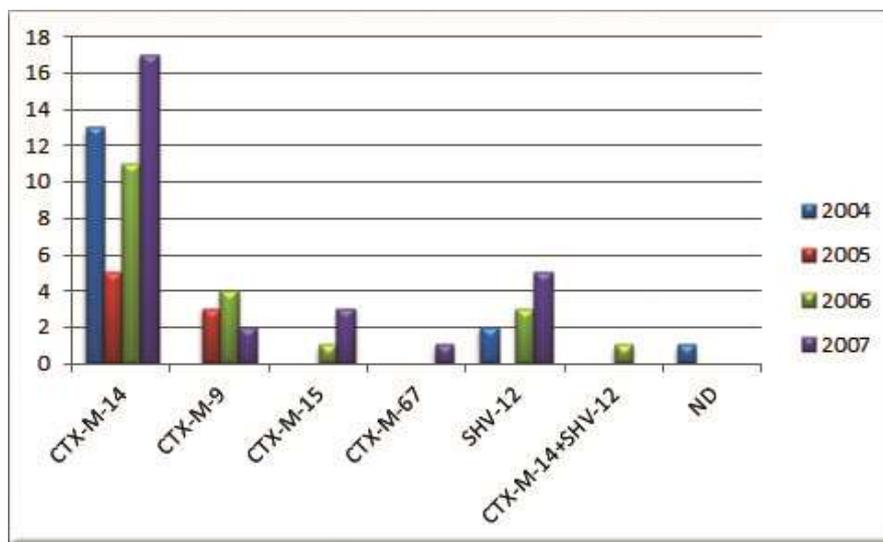
BLEE detectadas	Nº de aislados
CTX-M-14	46
CTX-M-9	9
SHV-12	10
CTX-M-14+SHV-12	1
CTX-M-15	4
CTX-M-67	1
No BLEE detectada	1

**Tabla 23** Asociación de BLEEs con otras beta-lactamasas en las 72 cepas clínicas BLEE<sup>+</sup> del estudio

BLEEs	Otras Beta-lactamasas asociadas	Numero de aislados
CTX-M-9	Ninguna	6
	TEM-1	3
CTX-M-14	Ninguna	22
	TEM-1	24
CTX-M-15	Ninguna	0
	OXA-1	1
	TEM-1+OXA-1	3
CTX-M-14+SHV12	Ninguna	1
CTX-M-67	Ninguna	0
	TEM-1	1
SHV-12	Ninguna	3
	TEM-1	7

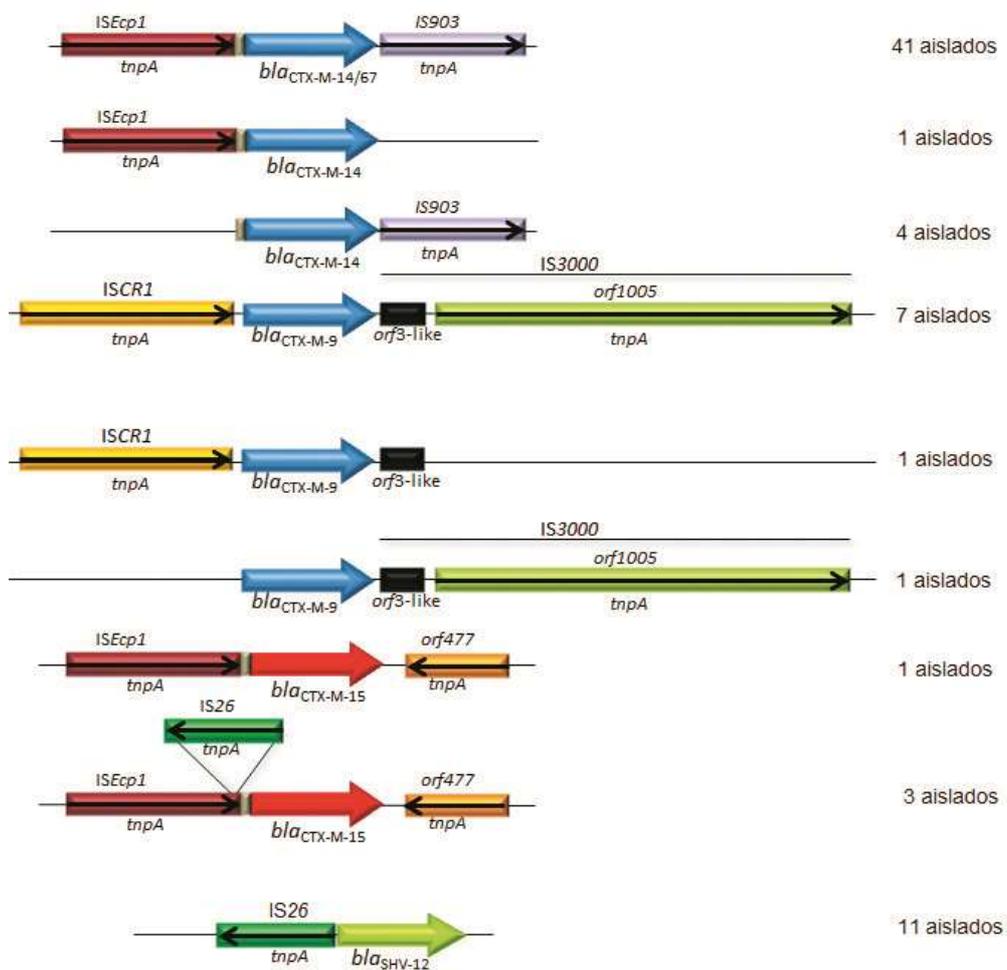
Se puede observar el predominio de las BLEEs pertenecientes al grupo CTX-M-9, y dentro de las diferentes variantes, la CTX-M-14 predominó frente a la CTX-M-9 y se ha identificado una variante poco común, la CTX-M-67, similar a CTX-M-14 pero con un cambio aminoacídico correspondiente a N109S. En cuanto a las CTX-M del grupo 1, solo se han localizado cuatro aislados que presentaban la variante CTX-M-15. Cabe destacar la existencia de una cepa con fenotipo BLEE<sup>+</sup> en la cual no se pudo identificar ninguno de los genes BLEEs estudiados.

La figura 20 muestra la evolución de BLEEs a lo largo de los 4 años testados. Cabe destacar la ausencia de CTX-M-15 en los 2 primeros años y su detección en los dos últimos. Asimismo, se observa un aumento a lo largo de los años de los aislados con SHV-12 y una disminución de los aislados con CTX-M-9.



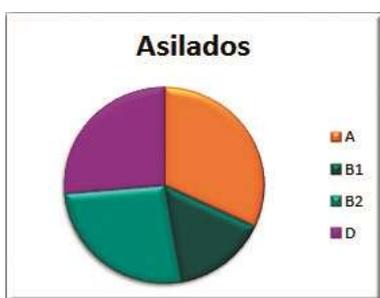
**Figura 20** BLEEs identificadas en las cepas clínicas de *E. coli* en función del año de aislamiento.

Los entornos de los genes de BLEEs detectados en nuestras cepas se muestran en la figura 21. Se pone en evidencia la importancia de las secuencias de inserción como elementos que flanquea los genes *bla*. El entorno del gen de la variante CTX-M-67 fue similar al correspondiente a CTX-M-14. Por otro lado, el entorno del gen de una beta-lactamasa CTX-M-14 no se pudo identificar.



**Figura 21** Entornos genéticos detectados en los genes *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-67</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub> en las cepas clínicas de *E. coli*.

#### 4.1.1.4 GRUPOS FILOGENÉTICOS



**Figura 22** Distribución de las cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en función de su grupo filogenético.

El estudio de los grupos filogenéticos, utilizando el criterio de clasificación de Clermont *et al* 2000, dio como resultado los valores que se muestran en la figura 22.

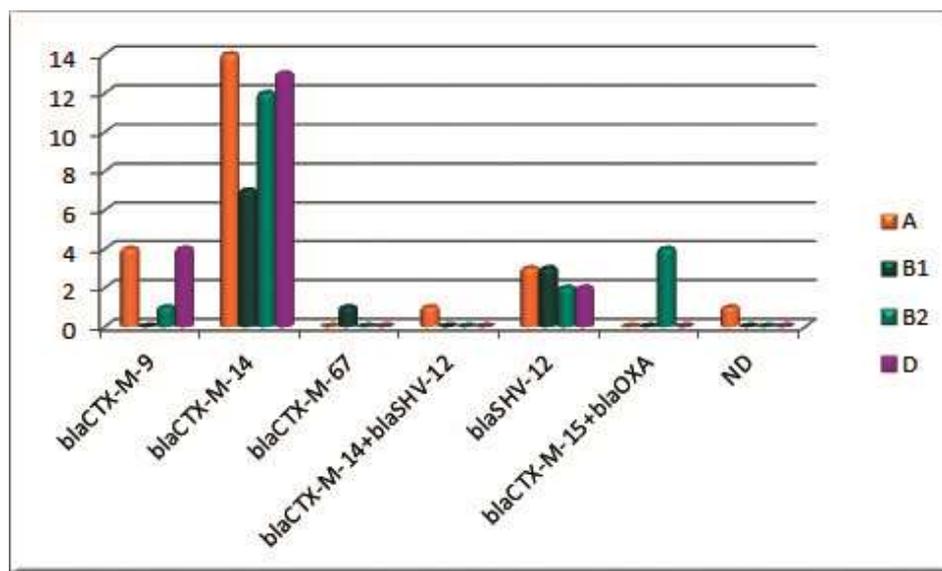
La tabla 24 muestra los grupos filogenéticos detectados en los aislados en función del tipo de BLEE que portan. Las cepas CTX-M-15-positivas fueron adscritas al grupo filogenético B2 y a la secuencia tipo ST131.

**Tabla 24** Grupos filogenéticos de las cepas clínicas en función del tipo de enzima BLEE

Genes <i>bla</i>	A	B1	B2	D	TOTAL
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	4	0	1	4	9
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	14	7	12	13	46
<i>bla</i> <sub>CTX-M-67</sub>	0	1	0	0	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1	0	0	0	1
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	3	3	2	2	10
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	0	0	4	0	4*
Gen <i>bla</i> no identificado	1	0	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>72</b>

\* Estas 4 cepas fueron adscritas a la secuencia tipo ST131

Se puede observar que el grupo filogenético A fue el más frecuentemente detectado, con un total de 23 aislados, seguido de cerca por los grupos B2 y D con 19 cada uno y por último, el grupo B1 con 11 aislados. El 53 % de los aislados BLEE<sup>+</sup> correspondieron a los grupos filogenéticos B2 y D, asociados con mayor frecuencia a infecciones extraintestinales.



**Figura 23** Distribución de las cepas clínicas en función del tipo de BLEE y grupo filogenético.

Observando la figura 23, es interesante ver que todas las cepas con BLEEs del grupo CTX-M-1 están englobadas en el grupo filogenético B2 y que dentro de las SHV, están los cuatro grupos representados y con pocas diferencias. En el caso de las cepas del grupo CTX-M-9, cabe destacar la menor frecuencia del filogruppo B1 (que esta ausente en las cepas con la enzima CTX-M-9).

#### 4.1.2 AISLADOS DE MUESTRAS FECALES DE PERSONAS SANAS Y DE PACIENTES

De un total de 99 muestras fecales de diferentes pacientes, remitidas al laboratorio de Microbiología del Hospital San Pedro de Logroño Hospital San Pedro para coprocultivo, el 7,1 % de las mismas contenían aislados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro y productoras de BLEEs.

Asimismo, se analizó un total de 126 muestras fecales obtenidas de personas voluntarias sanas, y se detectó *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en 5 de dichas muestras, lo que representó el 4 % de las mismas. Se tomó una cepa por muestra positiva (tanto de pacientes como de individuos sanos), obteniendo un total de 12 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> y se realizó la caracterización de los mecanismos de resistencia en dichas cepas, así como el estudio del tipo de enzima BLEE (tabla 25).

**Tabla 25** Caracterización de BLEEs, entornos, genes de resistencia y estudio de integrones en los aislados de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de muestras fecales de pacientes y de personas sanas.

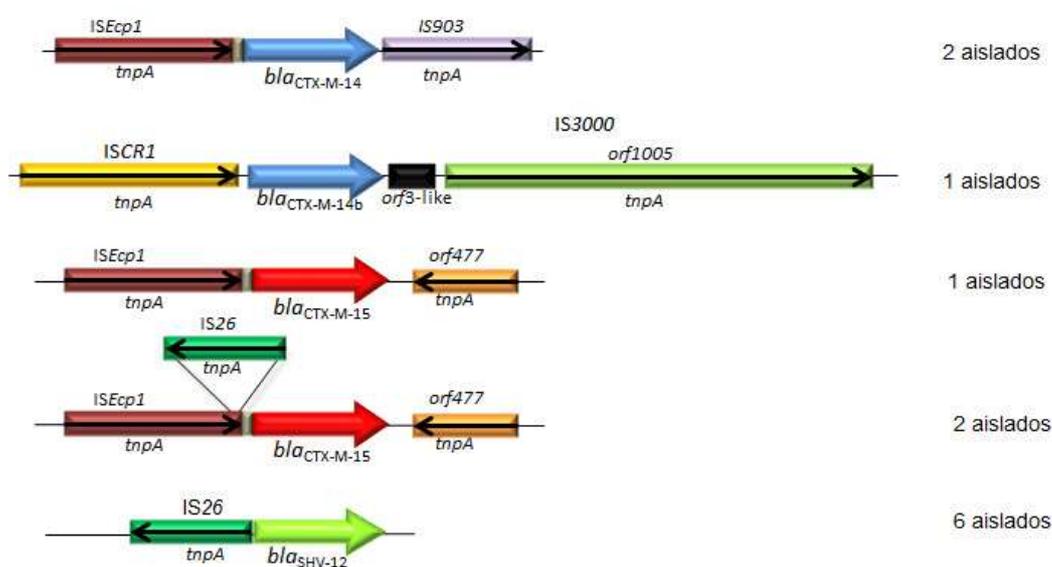
Cepa /Origen <sup>a</sup>	Fenotipo de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos <sup>b</sup>	Tipo de BLEE	Entorno gen BLEE	Genes de resistencia localizados fuera del integrón	Integrón Clase 1	<i>qacEA sul1</i>	Genes casete en la región variable del integrón	GF <sup>f</sup>	Patrón de PFGE	Secuencia tipo	Perfil plasmídico
C1535/P	SUL, SXT, STR	SHV-12	IS26	<i>sul2</i>	-	-	-	A	B	ST410	I1, FII, FIA, K
C1536/P	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT, STR	SHV-12	IS26	<i>tet(A)</i>	+	+	<i>dfrA16+aadA2; estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	A	C	ST23	I1, FII, FIA, W
C1537/P	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, STR	SHV-12	IS26	<i>tet(A), tet(B)</i>	+	-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	D	D	ST405	I1, FII, FIB
C1538/P	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, STR	SHV-12	IS26	<i>tet(A), tet(B)</i>	+	-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	D	E	ST405	I1, FII FIB
C1452/P	SUL*, STR*	CTX-M-14a	ISEcp1-IS903	-	-	-	-	A	A	ST32	K, FII W,
C1539/P	NAL, TET, SUL, KAN, STR	CTX-M-14a	ISEcp1-IS903	<i>tet(B), sul2</i>	-	-	-	D	F	ST117	K, FII, FIA HI2,
C1540/P	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, GEN, KAN, STR, TOB	CTX-M-15	ISEcp1-ORF477	<i>tet(A), aac(6)-Ib-cr</i>	- <sup>d</sup>	+	<i>dfrA17+aadA5</i>	A	G	ST10	FII, FIA, FIB
C3978/Hs	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, KAN, TOB	CTX-M-15	IS26ISEcp1-orf477	<i>tet(A), OXA-1, aac(6)Ib-cr</i>	+	+	<i>dfrA17+aadA5</i>	B2	J	ST131	FII, FIA, X
C3981/Hs	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, AMK, KAN, STR, TOB	CTX-M-15	IS26ISEcp1-orf477	<i>tet(A), OXA-1, aac(6)Ib-cr</i>	+	+	<i>dfrA17+aadA5</i>	B2	J	ST131	FII, FIA, X
C3980/Hs	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, STR	CTX-M-14b	ISCR1-IS3000 <sup>c</sup>	<i>tet(A)</i>	+	+	<i>dfrA16+aadA2</i>	B1	K	ST224	K, FII, FIB, HI1,
C3976/Hs	TET, SUL, SXT, STR	SHV-12	IS26	<i>tet(B)</i>	-	-	-	B1	H	ST101	FII, FIB, B/O
C3977/Hs	NAL, CIP, TET	SHV-12	IS26	<i>tet(B)</i>	-	-	-	A0	I	ST2205 <sup>e</sup>	I1, FII, FIB, B/O

<sup>a</sup>P: Paciente; Hs Humano sano; <sup>b</sup>\*Resistencia intermedia; <sup>c</sup>Asociado a un integrón de Tipo 1; <sup>d</sup>intI1ΔS26; <sup>e</sup>ST nuevo; <sup>f</sup>Grupo Filogenético

#### 4.1.2.1 VARIANTES DE BLEES Y ENTORNOS GENÉTICOS

Las variantes de BLEEs detectadas en los aislados de *E. coli* obtenidos de las muestras fecales de personas sanas fueron las siguientes: CTX-M-15, CTX-M-14b y SHV-12. Por otro lado, las variantes detectadas en los 7 aislados de las muestras fecales de pacientes fueron: CTX-M-15, CTX-M-14a y SHV-12. El gen de la beta-lactamasa OXA-1 fue detectado en las 2 cepas productoras de CTX-M-15 de las heces de personas sanas. (tabla 25)

Los entornos de los genes BLEEs identificados en estas cepas se indican en la figura 24.



**Figura 24** Entornos de los genes codificantes de BLEEs identificados en los aislados fecales de *E. coli* de pacientes y personas sanas.

#### 4.1.2.2 FENOTIPO Y GENOTIPO DE RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS

Todos los aislados BLEE<sup>+</sup>, excepto uno, presentaron un fenotipo de multiresistencia. No se detectó resistencia frente a imipenem (IMP) en los aislados BLEE<sup>+</sup> y la mayoría fue sensible a los aminoglucósidos amikacina, tobramicina o gentamicina, con alguna excepción. Sin embargo, 7 y 9 aislados respectivamente presentaron resistencia a kanamicina y estreptomicina. La detección de un elevado número de cepas con resistencia a este último aminoglucósido (STR), y también a sulfamidas (10 de 12) y al SXT (7 de 12) se explica por la alta presencia de integrones

en estas cepas. La resistencia a las fluoroquinolonas fue detectada también en un alto porcentaje de los aislados (8 de 12).

Tras la identificación fenotípica de las resistencias a antibióticos en los aislados fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>, se procedió a la caracterización de los genes de resistencia implicados. Diez de las 12 cepas fecales BLEE<sup>+</sup> presentaron resistencia a la tetraciclina y todas ellas contenían los genes *tet(A)* y/o *tet(B)*, no detectándose estos genes en ningún caso dentro de la region variable de los integrones. Tres de las cepas contenían el gen *aac(6)-Ib-cr* (una de pacientes y 2 de humanos sanos).

Se identificó la presencia de integrones de clase 1 en 7 aislados (4 de pacientes, y tres de personas sanas), identificándose 3 regiones variables diferentes (dos correspondientes a integrones clásicos y una a integrones defectivos en la region 3'-CS).

Es de interés destacar la detección del determinante *aadA* con dos variantes identificadas (*aadA2* y *aadA5*) en los 7 aislados portadores de integrones. Cinco de estos aislados presentaron genes *dfrA* (variantes *dfrA16* y *dfrA17*) que confieren resistencia a trimethoprim.

#### 4.1.2.3 TIPADO MOLECULAR

Todas las cepas de *E. coli* de pacientes y de personas voluntarias sanas presentaron patrones de PFGE diferentes con la excepción de dos cepas productoras de CTX-M-15 aisladas de personas sanas en las que se identificó el mismo patrón de PFGE y ambas cepas fueron adscritas a la secuencia tipo ST131.

Las cepas fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de pacientes fueron ubicadas en los grupos filogenéticos A y D y las procedentes de voluntarios sanos a los filogrupos B1, B2 y A0. Se observaron las siguientes asociaciones (grupo filogenético/ST) entre los aislados fecales: pacientes (A/ST410-ST23-ST32-ST10; D/ST405-ST117), voluntarios sanos (B2/ST131; B1/ST224-ST101; A0/ST2205). Los ST detectados en pacientes fueron diferentes a los de humanos sanos. Se detectó una cepa perteneciente a la secuencia tipo ST2205, que fue nueva y se registró en la base de datos de MLST. Es de destacar que las cepas con CTX-M-15 de voluntarios sanos fueron tipadas como ST131-filogrupo B2 y la de paciente como ST10-filogrupo D.

#### 4.1.2.4 PERFIL PLASMÍDICO

En la tabla 25 se puede observar el contenido en replicones plasmídicos de las cepas fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. Es de destacar que el determinante del replicón IncFII es una constante en todos los aislados fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. Junto con IncFII, los rep FIA y FIB estuvieron presentes en 11 de las 12 cepas y en uno de ellas, se detectaron ambos replicones. Cabe destacar la presencia del replicón IncI1 en todos los aislados con SHV-12 (excepto uno) y la presencia de IncK en todos los aislados productores de CTX-M-14a/b.

## 4.2 CEPAS DE *E. coli* BLEE<sup>+</sup> OBTENIDAS EN ANIMALES

### 4.2.1 PREVALENCIA DE LAS CEPAS DE *E. COLI* BLEE<sup>+</sup>

Se analizaron 126 muestras fecales de perros y 20 de dichas muestras fueron portadoras de *E. coli* con fenotipo BLEE<sup>+</sup>, representando el 16 % de las muestras analizadas. Se estudió una cepa por muestra positiva y los resultados de caracterización de dichas cepas se muestran en las Tablas 26 y 27

**Tabla 26** Caracterización de beta-lactamasas y tipado molecular de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> obtenidas de muestras fecales de perros sanos

Cepa de <i>E. coli</i>	Tipo de BLEE	Otras beta-lactamasas	Entorno gen BLEE	Grupo filogenético	Patrón PFGE	MLST
C2588	CTX-M-1		ISEcp1-orf477	B1	A	ST1913 <sup>a</sup>
C2589	CTX-M-1	TEM-1	ISEcp1-orf477	D	B	ST1914 <sup>a</sup>
C2590	CTX-M-1	TEM-1	ISEcp1-orf477	D	B	ST1914 <sup>a</sup>
C2579	CTX-M-32	TEM-1	ISEcp1-IS5-orf477	B1	C	ST224
C2582	CTX-M-32	TEM-1	ISEcp1-IS5-orf477	B1	D	ST224
C2580	CTX-M-14a		ISEcp1-IS903	D	E	ST38
C2568	CTX-M-14a		ISEcp1-ND	A	H	ST1615
C2569	CTX-M-14a	TEM-1	ISEcp1-IS903	A	I	ST1615
C2571	CTX-M-14a		ISEcp1-IS903	A	J	ST1615
C2587	CTX-M-14a		ISEcp1-IS903	B1	K	ST2062
C2576	CTX-M-14b		ISCR1-IS3000 <sup>+</sup>	A	F	ST176
C2574	CTX-M-14b	TEM-1	ISCR1-IS3000 <sup>+</sup>	B2	G	ST372
C2585	SHV-12		IS26	A	L	ST23
C2578	SHV-12		IS26	A	M	ST23
C2591	SHV-12		IS26	A	N	ST43
C2575	SHV-12		IS26	B1	O	ST57
C2572	SHV-12		IS26	D	P	ST57
C2583	SHV-12		IS26	A0	Q	ST665
C2586	SHV-12	TEM-1	IS26	A0	R	ST746
C2584	SHV-12	TEM-1	IS26	A	S	ST1286

<sup>+</sup> Asociado al Integrón de Clase 1; <sup>a</sup>ST nuevo

**Tabla 27** Fenotipo y genotipo de resistencia y contenido plasmídico de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de muestras fecales de perros sanos

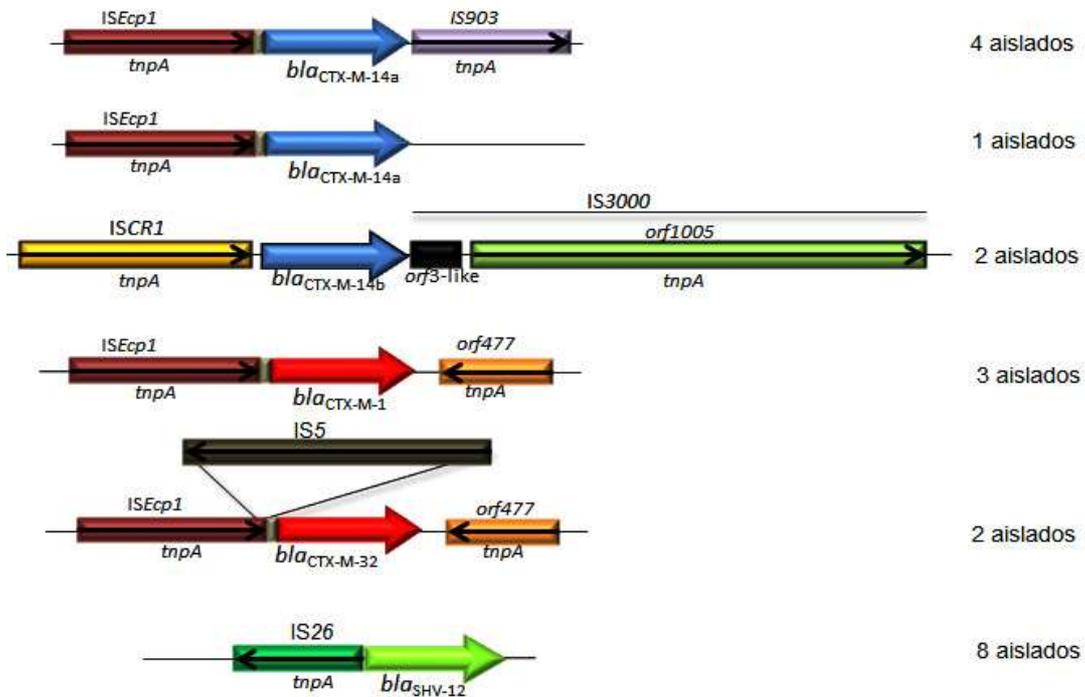
Cepa	Tipo de BLEE	Fenotipo de resistencia a antibióticos no beta-lactámicos	Integrón (Clase)	<i>QacEA</i> <i>SulI</i>	Regiones variables (Clase 1; [Clase 2])	Genes de resistencia localizados fuera de la estructura de integrón	Perfil Plasmídico
C2588	CTX-M-1	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, STR*	1	-	<i>aadA</i>	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	II, FIB, P, FII, B/O
C2589	CTX-M-1	NAL, TET, SUL, GEN*, STR*, TOB	-	-	-	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3')-I</i>	II, FIB, FII
C2590	CTX-M-1	NAL, TET, SUL, STR*, TOB	-	-	-	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3')-I</i>	II, FIB, FII
C2579	CTX-M-32	NAL, CIP, TET, KAN*, STR*	-	-	-	<i>tet(A)</i>	X, HI1, FIB, P, FII, B/O
C2582	CTX-M-32	NAL, CIP, STR*	-	-	-	-	X, FIB, P, FII, B/O
C2580	CTX-M-14a	NAL, TET, SUL, STR	1	+	<i>aadA</i>	<i>tet(A)</i> , <i>sul2</i>	K, FII, P
C2568	CTX-M-14a	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT, GEN, TOB, KAN, STR,	1	+	<i>dfrA1+aadA1</i>	<i>sul2</i>	K, FII, FIB
C2569	CTX-M-14a	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT, GEN, TOB, KAN, STR	1	+	<i>dfrA1+aadA1</i>	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3')-IV</i> , <i>aph(3')Ia</i>	K, FII, FIB
C2571	CTX-M-14a	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT, GEN, TOB, KAN, STR	1	+	<i>dfrA1+aadA1</i>	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3')-IV</i> , <i>aph(3')Ia</i>	K, FII, FIB
C2587	CTX-M-14a	NAL, TET, STR*	-	-	-	<i>tet(A)</i>	II, FII, FIB
C2576	CTX-M-14b	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT, STR	1	+	<i>dfrA16+aadA2</i> ; <i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA</i> <i>+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	K, II, FII, FIB
C2574	CTX-M-14b	SUL, SXT, STR	-	+	<i>dfrA1+aadA1</i>	-	K, II
C2585	SHV-12	NAL, TET, CLO, SUL, STR*	1	-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA</i> <i>+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FII, B/O
C2578	SHV-12	NAL, CIP, TET, CLO, SUL, SXT*, TOB, STR	-	-	-	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FII
C2591	SHV-12	NAL, CIP, TET, SUL, GEN*, TOB, STR*	1	-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA</i> <i>+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FII
C2575	SHV-12	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, GEN, TOB*, KAN, STR	1,2	+	<i>aadA</i> ; [ <i>dfrA1+sat2+aadA2</i> ]	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3')Ia</i>	II, FIB, P, FII, K
C2572	SHV-12	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, GEN, KAN, STR	1,2	-	<i>aadA</i> ; [ <i>dfrA1+sat2+aadA2</i> ]	<i>tet(B)</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3')Ia</i>	II, FIB, P, FII, K
C2583	SHV-12	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, GEN, STR	1,2	+	<i>aadA</i> ; [ <i>dfrA1+sat2+aadA2</i> ]	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FIC, FII, B/O
C2586	SHV-12	TET, CLO, SUL, SXT	1	+	<i>dfrA16+aadA2</i> , <i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA</i> <i>+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FII, B/O
C2584	SHV-12	NAL, CIP, TET, KAN*, STR*	-	-	-	<i>tet(A)</i>	II, FIB, FII, B/O

\* Resistencia intermedia;

#### 4.2.2 VARIANTES DE BETA-LACTAMASAS Y ENTORNOS

Los tipos de BLEEs detectados por PCR y secuenciación correspondieron a variantes del tipo CTX-M (*CTX-M-14a* y *CTX-M-14b* del grupo 9 y *CTX-M-1* y *CTX-M-32* del grupo 1) y del tipo SHV (variante *SHV-12*). En el 40% de las cepas BLEE<sup>+</sup> se detectó la presencia de una beta-lactamasa de tipo TEM-1 (tabla 26). La figura 25 muestra los entornos detectados en los genes codificantes de BLEEs de las cepas de origen canino.

Los entornos detectados son los típicos para las beta-lactamasas identificadas, presentando una variación solo en una *CTX-M-14a*, en la que el elemento *IS903* no fue localizado.



**Figura 25** Entornos de genes de BLEEs detectados en las cepas aisladas de perros.

### 4.2.3 FENOTIPO Y GENOTIPO DE RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS

La figura 26 muestra el perfil de resistencia a antibióticos de las 20 cepas BLEE<sup>+</sup> de origen canino. Un porcentaje elevado de aislados presentaron resistencia a tetraciclina, ácido nalidíxico o sulfamidas. Es de destacar la elevada frecuencia de resistencia al aztreonam.



**Figura 26** Número de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de origen canino que presentan resistencias a los diferentes antibióticos testados.

AMC: amoxicilina-ác. clavulánico; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima;  
 ATM: aztreonam; FOX: cefoxitina; IMP: imipenem; AMP: ampicilina NAL:  
 ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; TET: tetraciclinas; SXT: trimetoprim-  
 sulfametoxazol; SUL: sulfamidas; CLO: cloranfenicol; AMK: amikacina;  
 GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; KAN: kanamicina; STR: estreptomina

La tabla 27 presenta los genes de resistencia a antibióticos detectados en estas cepas, tanto dentro como fuera de la estructura de los integrones. Fuera de la estructura de los integrones se han encontrado básicamente genes relacionados con la resistencia a las tetraciclinas (*tet(A)*, *tet(B)*) y a los aminoglucósidos gentamicina, tobramicina o kanamicina (*aac(3')-IV*, *aph(3')Ia*). También se ha localizado fuera de la estructura de los integrones el gen *sul2*, que confiere resistencia a sulfamidas.

Los integrones que se han identificado en las cepas BLEE<sup>+</sup> de perros han sido de dos tipos, integrón de clase 1 e integrón de clase 2. Tres aislados albergaban integrones de clase 1 y 2 con los mismos genes casetes en ambos tipos de integrón (tabla 27). El

65 % de los aislados presentaron integrones de clase 1, distinguiéndose dos clases: integrones conservados e integrones defectivos (ligados a *sul3*). Entre todos estos integrones de clase 1, se ha observado escasa variabilidad en cuanto a las regiones variables, todos los defectivos presentaron la misma estructura de genes casete y en el mismo orden (*estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3*), y en cuanto a los integrones conservados solo presentaron tres tipos de regiones variables (*aadA1/2*, *dfrA1+aadA1* y *dfrA16+aadA2*).

#### 4.2.4 TIPADO MOLECULAR

Todas las cepas de *E. coli* de animales sanos (perros) presentaron patrones de PFGE diferentes con la excepción de dos cepas que presentaron el mismo patrón de PFGE, las cuales producían CTX-M-1 y en estas cepas se identificó la misma secuencia tipo (ST1914) y filogrupo D. Las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de perros fueron adscritas mayoritariamente a los grupos filogenéticos A y A0 (50 % de las cepas). Una de las cepas fue adscrita al filogrupo B2 y fue tipada en la secuencia tipo ST372. Se observaron las siguientes asociaciones (grupo filogenético/ST): (A/ST176-ST1615-ST23-ST43-ST1286); (A0/ST665-ST46); (B1/ST57-ST224-ST1913-ST2062); (B2/ST372); (D/ST57-ST38-ST1914). Las secuencias ST1913 y ST1914 fueron nuevas y descritas por primera vez en esta tesis.

#### 4.2.5 PERFIL PLASMÍDICO

En la tabla 27 se presenta el perfil plasmídico de los aislados BLEE<sup>+</sup> de perros. Destaca que el 100 % de los aislados presentaron los determinantes repFIB e IncFII. La media de determinantes *rep* detectados en los aislados fue de 3, aunque hubo aislados hasta con seis determinantes *rep* diferentes. Es interesante ver que las cepas con CTX-M-14a/b contenían el determinante IncK, entre otros, y los aislados con SHV-12 el determinante IncI1.

## 4.3 CEPAS OBTENIDAS EN ALIMENTOS

4.3.1 PREVALENCIA DE LA CEPAS *E. coli* BLEE<sup>+</sup>

Se detectó cepas de *E. coli* con fenotipo BLEE<sup>+</sup> en el 11 % de las 360 muestras de alimento estudiadas, considerando los dos periodos (2007-2009 y 2011) y se seleccionó una cepa BLEE<sup>+</sup> por muestra (40 aislados en total). Todas las muestras positivas para *E. coli* BLEE<sup>+</sup> fueron de pollo, excepto una muestra que fue de cerdo. Es interesante remarcar que entre los periodos muestreados, el porcentaje de muestras de pollo con *E. coli* BLEE<sup>+</sup> se incrementó en el segundo periodo respecto al primero pasando de un 21,5 % a un 50 % (tabla 28).

**Tabla 28** Muestras de alimentos estudiadas y su contenido en *E. coli* y en *E. coli* BLEE<sup>+</sup>

Tipo de Muestra	Número de muestras	Número de muestras (%) con <i>E. coli</i>	Número de muestras (%) con <i>E. coli</i> -BLEE <sup>+</sup>	Muestras con <i>E. coli</i> -BLEE <sup>+</sup> en dos periodos estudiados (%)	
				2007-2009 (%)	2011 (%)
<b>Pollo</b>	155	97 (63 %)	39 (25 %)	29 (21,5 %)	10 (50 %)
<b>Cerdo</b>	77	8 (10 %)	1 (1 %)	1 (0,3 %)	0
<b>Ternera</b>	56	5 (9 %)	-	0	0
<b>Cordero</b>	23	2 (9 %)	-	0	0
<b>Caza</b>	20	0	-	0	0
<b>Pavo</b>	12	1 (8 %)	-	0	0
<b>Ternera/Cerdo</b>	9	0	-	0	0
<b>Conejo</b>	8	1 (12,5 %)	-	0	0
<b>Total</b>	360	114 (32 %)	40 (11 %)	30 (10 %)	10 (15%)

**Tabla 29** Tabla resumen de los datos de caracterización fenotípica y genotípica de las 40 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de alimentos (todas de origen aviar excepto una de origen porcino)

Cepas	Fenotipo R <sup>a</sup>	BLEE	Otras beta-lactamasas	Entornos genes BLEE <sup>b</sup>	Integrasa/qa cEΔsu l	Regiones variables (Tipo 1, [Tipo 2])	Genes localizados fuera del Integrón	Grupos Filogenéticos	Perfil plasmídico	ST	Perfil PFGE
C4933	TET, SUL, SXT*, TOB, KAN, STR	CTX-M-1		C	-	-	<i>tet(A), sul2, aadA</i>	D	FII, II, FIB	ST38	AM
C4742	NAL, CIP*, TET, SUL, STR*	CTX-M-1		C	-	-	<i>tet(A), sul2</i>	D	FII, II, FIB	ST117	AD
C4744	NAL, CIP, TET, SUL	CTX-M-1		C	-	-	<i>tet(A), sul2</i>	B1	FII, II, W	ST906	AF
Pn463 <sup>k</sup>	NAL, TET, SUL, STR	CTX-M-32		E	-	-	<i>tet(B), sul1, sul2, aadA</i>	D	FIB, W, FII, K	ST648	Q
Pn432	NAL, TET, SUL, SXT, CLO, STR	CTX-M-9		B	1,2/+	<i>dfrA16+aadA2:[sat2+aadA1]</i>	-	A	FII, II	ST10	H
C4747	NAL, TET, SXT, SUL, GEN, STR	CTX-M-9		B	1/+	<i>aadA; dfrA16+aadA2</i>	<i>tet(A), sul1, aadA, aac(3)I</i>	A	W, P, B/O	ST10	AI
Pn442	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, CLO, STR	CTX-M-9	TEM-1	B	1/+	<i>dfrA16+aadA2</i>	<i>tet(A), sul1, sul2</i>	A0	FII, HI2, FIB, FIC, A/C, B/O	ST665	K
C1945	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, CLO, STR	CTX-M-9	TEM-1	B	1/+,-	<i>dfrA16+aadA2; estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A), sul1</i>	A0	FII, HI2, FIB, FIC, B/O	ST665	Y
Pn431	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, STR	CTX-M-9		B	1/+	<i>dfrA16+aadA2</i>	<i>sul1</i>	B2	FII, II, K	ST770	G
Pn480	NAL	CTX-M-14a		A <sup>s</sup>	-	-	-	A	II, N, B/O	ST10	S
Pn437	NAL, TET, SUL, SXT, STR	CTX-M-14a		A	1/+	<i>drfA1+aadA1</i>	<i>tet(B), sul1, sul2</i>	A0	K, FII, FIB	ST93	I
Pn453	NAL, CIP, TET, KAN*, STR	CTX-M-14a	TEM-1	A	-	-	<i>tet(A), aadA</i>	B1	II, B/O	ST155	M
Pn385	NAL, TET, SUL	CTX-M-14a		A	-	-	<i>tet(A), sul2</i>	B1	K, FII, X, FIB	ST155	B
Pn421	NAL, TET, GEN*, KAN*, STR	CTX-M-14a		A <sup>r</sup>	-	-	<i>tet(A)</i>	B1	II, FII, B/O	ST223	E
Pn384	NAL, CIP, TET	CTX-M-14a		A	-	-	<i>tet(A)</i>	B1	FII, N, FIB, Y, B/O	ST359	A

## Resultados

Cepas	Fenotipo R <sup>a</sup>	BLEE	Otras beta-lactamasas	Entornos genes BLEE <sup>b</sup>	Integrasa/qa cE□sul	Regiones variables (Tipo 1, [Tipo 2])	Genes localizados fuera del Integrón	Grupos Filogenéticos	Perfil plasmídico	ST	Perfil PFGE
<b>Pn454</b>	NAL, CIP, TET, KAN*, STR*	CTX-M-14a		A	-	-	<i>tet(A), aadA</i>	B1	K, FII, N, FIB	ST359	N
<b>C1839</b>	NAL, CIP, TET, STR	CTX-M-14a	TEM-1	A	-	-	<i>tet(A)</i>	B1	II, FII, FIB, B/O	ST359	X
<b>Pn484</b>	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, STR	CTX-M-14a		A	1/+	<i>dfrA1+aadA</i>	<i>tet(A), sul1, sul2</i>	A	II, FII, N, FIB	ST617	T
<b>Pn479</b>	NAL, CIP	CTX-M-14a		A	-	-	-	A0	K, FII, FIB, FIC,	ST665	R
<b>C1946</b>	NAL, CIP, TET, SUL, SXT*, KAN, STR*	CTX-M-14a		A	-	-	<i>tet(A), aadA, sul1, sul3, aph(3')-Ia</i>	B1	K, FII, N, FIB,	ST1639	Z
<b>C1949</b>	NAL, TET, KAN*, STR	CTX-M-14a		A	2	<i>dfrA1+sat2+aadA1</i>	<i>tet(A)</i>	A	K	ST1912 <sup>c</sup>	AB
<b>Pn386</b>	NAL, GEN*, TET, CLO, STR*	CTX-M-14a		A	1/+	<i>aadA</i>	<i>tet(A)</i>	A	FII, FIB, FIC, B/O	ST1968 <sup>c</sup>	C
<b>Pn459</b>	NAL, SUL, TET, STX, KAN, STR	CTX-M-14b		B	-/+	<i>dfrA16+aadA2</i>	<i>tet(B), sul1, sul2, aph(3')-Ia</i>	A	K, HI2	ST10	O
<b>Pn456</b>	NAL, TET, SUL, SXT, CLO, STR, KAN	CTX-M-14b		B	1/+	<i>dfrA16+aadA2</i>	<i>tet(B), sul1, sul2, aph(3')-Ia</i>	D	II, FII, FIB	ST117	Ñ
<b>Pn449</b>	NAL, SUL, SXT, KAN*, STR	CTX-M-14b		B	-/+	<i>dfrA16+aadA2</i>	-	D	K, FII, Y	ST2027 <sup>c</sup>	L
<b>C4746</b>	CIP, TET, SXT, KAN, STR	SHV-12		F	-	-	<i>tet(B), aph(3')-Ia, aadA</i>	D	II, FIB, FII, B/O	ST57	AH
<b>C4748</b>	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, KAN, STR	SHV-12		F	-	-	<i>tet(B), sul2, aph(3')-Ia, aadA</i>	D	FII, FIB, K	ST57	AJ
<b>Pn461</b>	NAL, CIP, TET, SUL, SXT, STR	SHV-12	TEM-1	F	-	-	<i>tet(A), sul2, aadA</i>	D	II, FIB, FII	ST117	P
<b>C1947</b>	ATM*, NAL, CIP, TET, SUL, CLO*, STR	SHV-12	TEM-1	F	1/-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(B)</i>	B1	II, FIB, FII, B/O	ST162	AA
<b>Pn439</b>	NAL, CIP, TET, STR*	SHV-12		F	-	-	<i>tet(A)</i>	B1	II, FIB, Y, FII, B/O	ST224	J

Cepas	Fenotipo R <sup>a</sup>	BLEE	Otras beta-lactamasas	Entornos genes BLEE <sup>b</sup>	Integrasa/qa cE□sul	Regiones variables (Tipo 1, [Tipo 2])	Genes localizados fuera del Integrón	Grupos Filogenéticos	Perfil plasmídico	ST	Perfil PFGE
<b>Pn486</b>	NAL, TET	SHV-12		F	-	-	<i>tet(A)</i>	B1	I1, B/O	ST351	U
<b>Pn387</b>	NAL, CIP, TET, SUL, CLO, STR*	SHV-12		F	1/-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	B1	I1, N, FIB, FII, B/O	ST359	D
<b>C4750</b>	TET, SUL, SXT, STR	SHV-12	TEM-1	F	1/+	<i>dfrA1+aadA1</i>	<i>tet(A), sul1, sul2, aadA</i>	A0	FII, FIB, P, K	ST746	AL
<b>C1836</b>	NAL, CIP*, TET, SUL, SXT, STR	SHV-12	TEM-1	F	1/+	<i>dfrA1+aadA</i>	<i>tet(A), sul1, sul2</i>	B1	I1, FIB, FII, B/O	ST872	V
<b>C1951</b>	NAL, TET, KAN, STR	SHV-12		F	1/+	<i>dfrA1+aadA1</i>	<i>tet(A), sul1</i>	A	I1, B/O	ST880	AC
<b>Pn422</b>	NAL, TET, SUL, SXT*, CLO, STR	SHV-12	TEM-1	F	1/-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(B)</i>	B1	I1, FIB, FII, B/O	ST949	F
<b>C1838</b>	NAL, TET, SUL, CLO, STR	SHV-12		F	1/-	<i>estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	<i>tet(A)</i>	A	I1, FII, B/O	ST1911 <sup>c</sup>	W
<b>C4749</b>	NAL, CIP	SHV-12	TEM-1	F	-	-	-	D	FII, HI1, FIB, K	ST3087 <sup>c</sup>	AK
<b>C4745</b>	NAL, TET, SUL	SHV-12+ CTX-M-1		D/F	-	-	<i>tet(A), sul2</i>	B2	I1, FII, FIB, K	ST131	AG
<b>C4743</b>	KAN*, STR*	TEM-52c		-	-	-	-	A0	I1, W, K	ST3086 <sup>c</sup>	AE

<sup>a</sup>No se presentan los antibióticos beta-lactámicos; <sup>b</sup>Entornos representados en la figura 25; \*Sensibilidad intermedia; A<sup>s</sup>Entorno sin *ISEcp1* detectado; <sup>c</sup>ST nuevo; <sup>&</sup> cepa de origen porcino

#### 4.3.2 VARIANTES DE BLEEs Y ENTORNOS

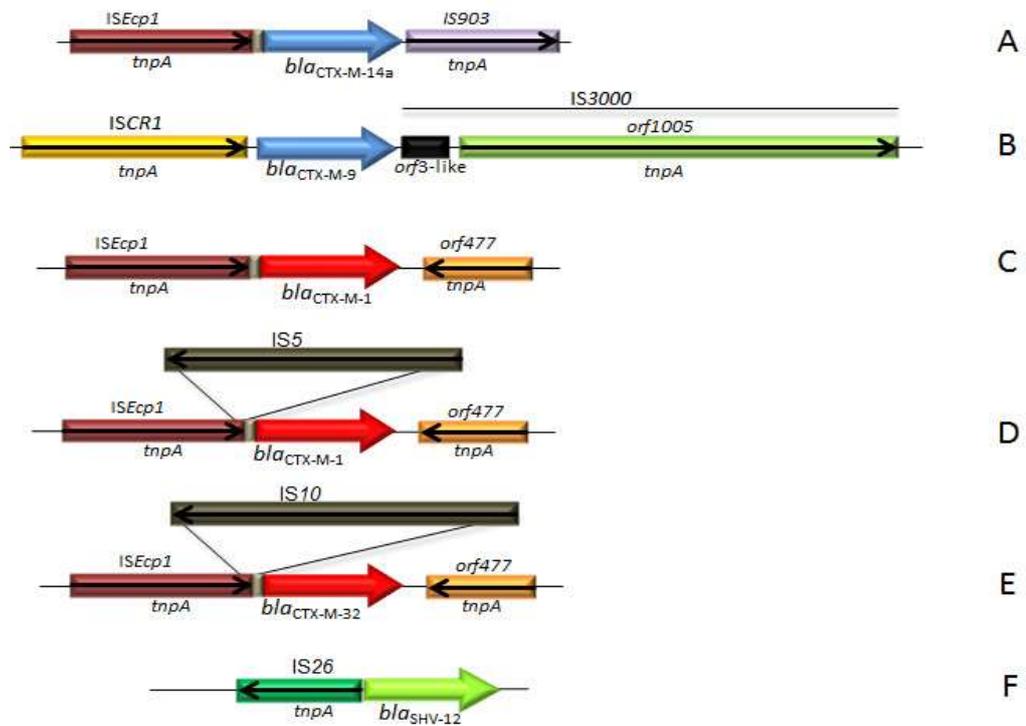
Las BLEEs identificadas en las 40 cepas de alimentos caracterizadas se presentan en la tabla 30:

**Tabla 30** Beta-lactamasas identificadas en las 360 muestras de alimento de los dos periodos analizados

Periodo	Número de <i>E. coli</i> BLEE+	CTX-M detectada					SHV-12	TEM-52c
		Grupo 1		Grupo 9				
		Tipo 1	Tipo 32	Tipo 9	Tipo 14a	Tipo 14b		
<b>2007-2009</b>	30	0	1	4	13	3	9	0
<b>2011</b>	10	4	0	1	0	0	5	1
<b>TOTAL</b>	40	4	1	5	13	3	14	1

Es interesante destacar que la única cepa productora de TEM-52 fue localizada en el periodo de muestreo del año 2011 y que las BLEEs pertenecientes al Grupo 9 de CTX-M sufrieron una drástica disminución en 2011 en comparación con el periodo 2007-2009. En cuanto a las BLEEs del Grupo 1, se han identificado dos variantes, cada una en un periodo diferente (CTX-M-32 en 2007-2009 y CTX-M-1 en 2011).

La figura 27 muestra los entornos de los genes codificantes de BLEEs detectados en las cepas de alimentos.



**Figura 27** Entornos de los genes codificados de BLEEs detectados en las cepas de *E. coli* de alimentos.

## 4.3.3 FENOTIPO Y GENOTIPO DE RESISTENCIA FRENTE A ANTIBIÓTICOS

El fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos de las cepas BLEE<sup>+</sup> de alimentos se puede observar en la Tabla 31, destacando los altos porcentajes de resistencia frente a fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas, SXT y estreptomicina.

**Tabla 31** Porcentaje de resistencia y presencia de determinantes de resistencia a los antibióticos en los aislados *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de alimentos.

Antibióticos testados	Número de aislados resistentes	Porcentaje de aislados resistentes	Genes de resistencia (número de aislados)
ácido nalidíxico	36	90%	-
ciprofloxacino	18	45%	-
tetraciclina	35	87,5%	<i>tet(A)</i> (25), <i>tet(B)</i> (8), ND (2)
estreptomicina	33	82,5%	<i>aadA1</i> (5), <i>aadA2</i> (6), <i>aadA1+sat2</i> (2), <i>aadA1+aadA2</i> (5), <i>aadA</i> (7), ND (8)
amikacina	0	-	-
gentamicina	1	2,5%	<i>acc(3')-I</i> (1)
kanamicina	7	17,5%	<i>aph(3')Ia</i> (5), ND (2)
tobramicina	0	-	-
sulfonamidas	25	62,5%	<i>sul1</i> (3), <i>sul2</i> (7), <i>sul3</i> (4), <i>sul1+sul2</i> (8), <i>sul1+sul3</i> (2), ND (1)
trimetoprim/ sulfametoxazol	16	40%	<i>dfrA1</i> (5), <i>dfrA16</i> (7), ND (4)
cloranfenicol	9	22,5%	<i>cmlA</i> (5), ND (4)

ND: no se detecta ninguno de los genes específicos estudiados

Con respecto a los integrones, 18 cepas fueron portadoras de integrones, de las cuáles, 16 portaban integrones de clase 1, una cepa portaba un integrón de clase 2 y una cepa fue portadora de ambos tipos de integrones. Las regiones variables identificadas entre los integrones de clase 1 presentaron baja variabilidad, en concreto se identificaron 4 organizaciones de genes casete diferente, uno de los cuales formaba parte de un integrón defectivo. En cuanto a los genes casetes identificados dentro de las regiones variables de las dos cepas portadoras de este tipo de integrón, ambos presentaron diferentes tipos (tabla 32).

**Tabla 32** Tipos de organizaciones de genes casetes detectados en las regiones variables de los integrones de clase 1 y 2 en las cepas de *E. coli* de alimentos

Tipos de regiones variables de Integrones de clase 1	Número de cepas
<i>aadA</i>	2
<i>drfA1+aadA1</i>	5
<i>dfrA16+aadA2</i>	8
<i>estX+psp+aadA2+cmIA+aadA+qacH+IS440+sul3</i>	5
Tipos de regiones variables de Integrones de clase 2	Número de cepas
<i>sat2+aadA1</i>	1
<i>dfrA1+sat2+aadA1</i>	1

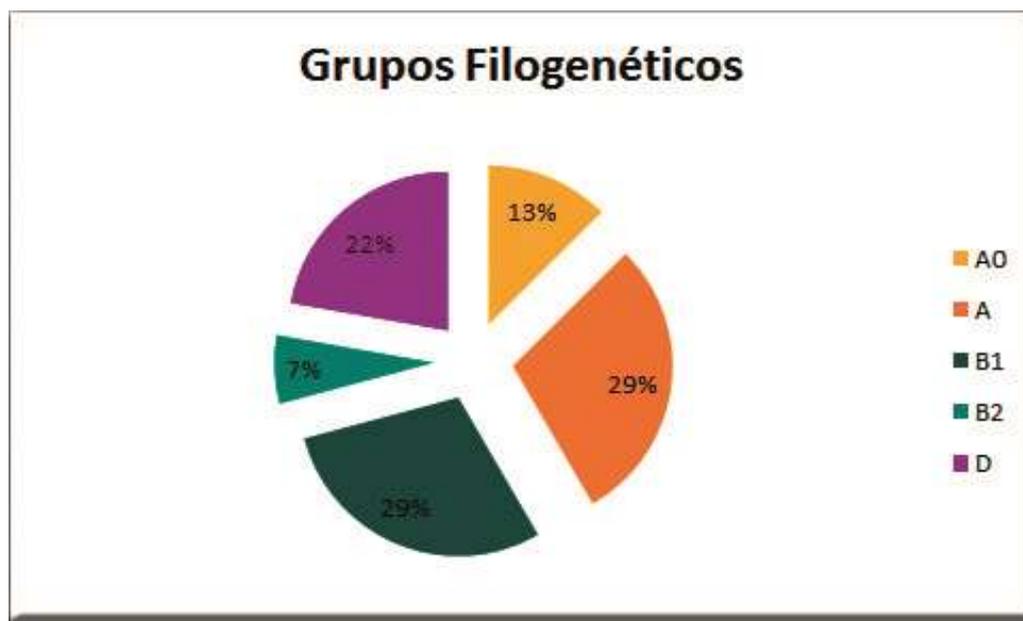
#### 4.3.4 PERFIL PLASMÍDICO

Los perfiles plasmídicos obtenidos en las cepas alimentarias fueron muy variados. Se presentan los datos de dichos perfiles de plasmidos y el contenido en genes codificantes de BLEEs en la Tabla 29. Independientemente de la beta-lactamasa que porte el aislado de *E. coli*, se puede ver que el determinante IncFII es detectado en casi todos ellos. También es interesante remarcar la presencia de IncII en casi la totalidad de los aislados que presentan la beta-lactamasa SHV-12 y que la posible relación CTX-M-14 e IncK es factible aunque no probada por hibridación.

#### 4.4 TIPADO MOLECULAR DE LOS AISLADOS DE DIFERENTES ORÍGENES.

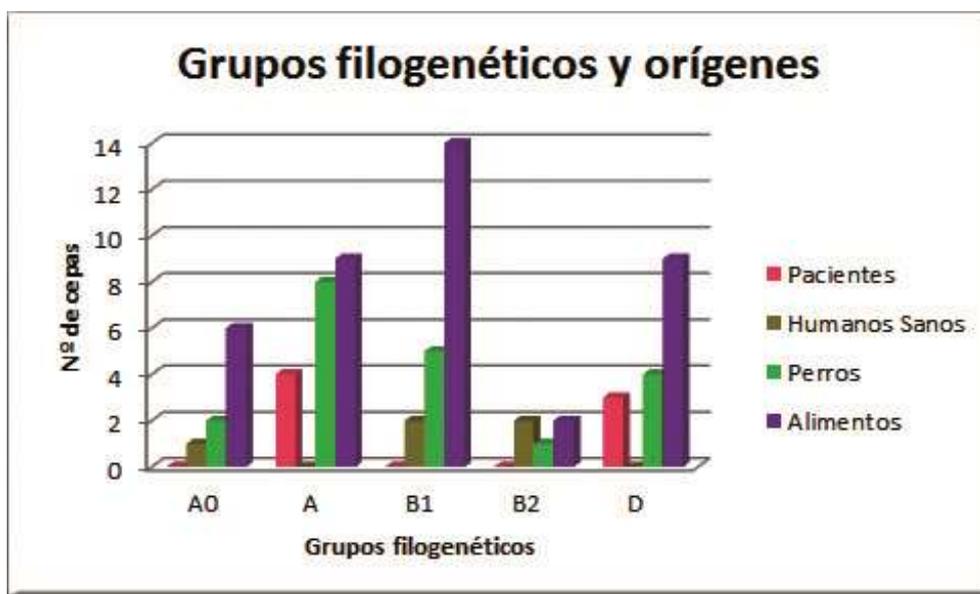
##### 4.4.1 GRUPOS FILOGENÉTICOS

Aplicando las reglas de determinación para identificar los grupos filogenéticos, tenemos cinco grupos, tres más asociados a las bacterias comensales (A0, A y B1) y dos que se han asociado con mayor frecuencia a infecciones extraintestinales (B2 y D).



**Figura 28** Distribución de los grupos filogenéticos entre el total de las cepas.

Se puede observar una proporción similar de cepas de los grupos filogenéticos A, A0 y B1, de forma que suman más del 70 % de las cepas identificadas. Es interesante observar que el siguiente grupo filogenético en frecuencia es el D, con un 22 % de los aislados.

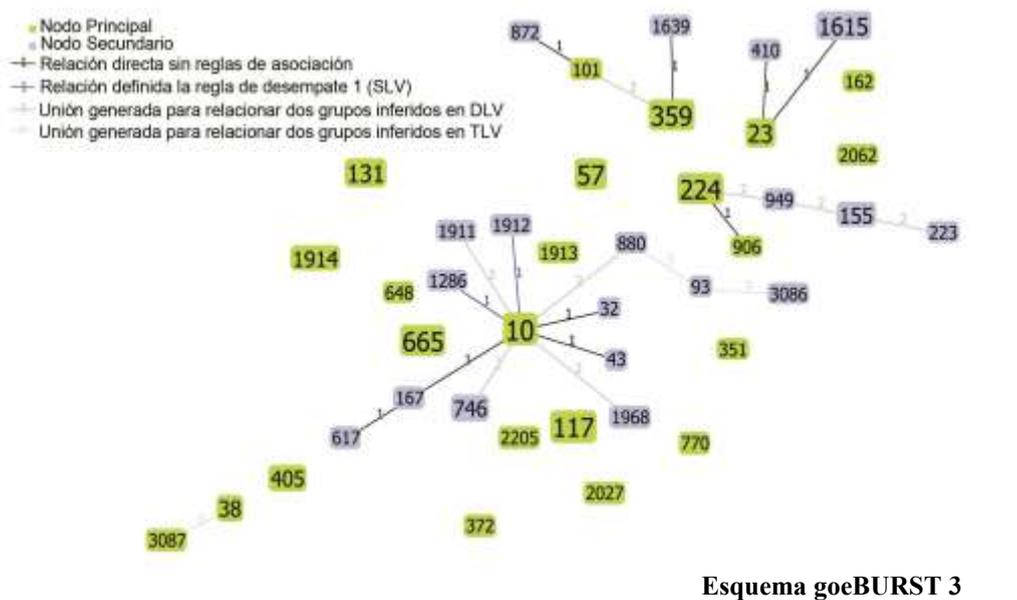
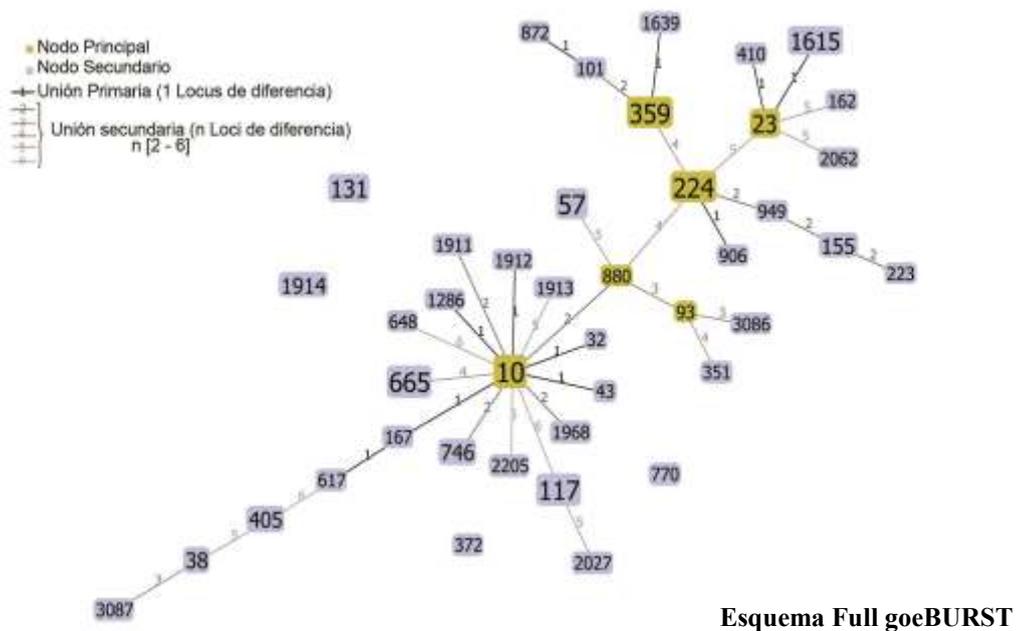


**Figura 29** Grupos filogenéticos detectados en las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en función del origen de las mismas.

Se puede estudiar la distribución de los grupos filogenéticos en función del origen de las cepas de *E. coli*. El número de cepas de cada origen es muy variable y esto puede afectar a la interpretación de los resultados. En las cepas de alimentos y de perros se detectaron todos los grupos filogenéticos. En el caso de las cepas alimentarias, el grupo filogenético mayoritario fue el B1, seguido por los grupos A y D. En las cepas de origen canino, el grupo más frecuentemente detectado fue el A, seguido del B1 y D. En ambos casos (alimentos y perros), el grupo B2 fue minoritario. Por otro lado, si consideramos las cepas de origen humano (pacientes e individuos sanos de forma conjunta), los grupos más detectados fueron el A y D. Curiosamente, el grupo filogenético B2 fue detectado en cepas fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de individuos sanos, y sin embargo no en las obtenidas de pacientes.

#### 4.4.2 SECUENCIAS TIPO

Se detecta una gran diversidad de secuencias tipo (n=39) entre las 72 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> obtenidas de alimentos, animales y humanos. La figura 30 presenta las diferencias de alelos entre STs mediante los esquemas goeBURST, de forma que el número entre las uniones indica la cantidad de alelos diferentes entre los STs unidos por esa línea.



**Figura 30** Relación de todos los STs obtenidos en las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes. El esquema superior (Full goeBURST) presenta las relaciones totales entre STs, diferenciando nodos como principales, secundarios y nodos nexa (se asocian los ST que presentan hasta 6 alelos diferentes). El esquema inferior (goeBURST 3 niveles) define las relaciones hasta tres niveles, une los STs que son más similares, dejando a los diferentes fuera de los grupos y asignándoles temporalmente una condición de nodo primario (se asocian los ST que presentan hasta 3 alelos diferentes).

Según el segundo esquema goeBURST 3 niveles, hay una gran variedad de ST libres o singletons, existiendo un solo Complejo Clonal claro (SCC10) y varios Complejos clonales menos diferenciados como puedan ser SCC23, SCC224, SCC101-SCC359.

La existencia de Complejos clonales implica una relación clonal entre los diferentes STs englobados. En este aspecto, el esquema superior (Full goeBURST) mantiene el criterio respecto a algunas agrupaciones y elimina otras. Mantiene SCC10, SCC224, SCC23 y SCC359 pero ST101 lo asocia como un nexo secundario con dos diferencias frente a SCC359. Pero asciende el ST880 a categoría de nodo principal, así como ST93. En este caso, se puede considerar ST880 un subcomplejo clonal y nexo entre SCC10 y SCC224, mientras que ST93 sí que tomaría entidad como SCC.

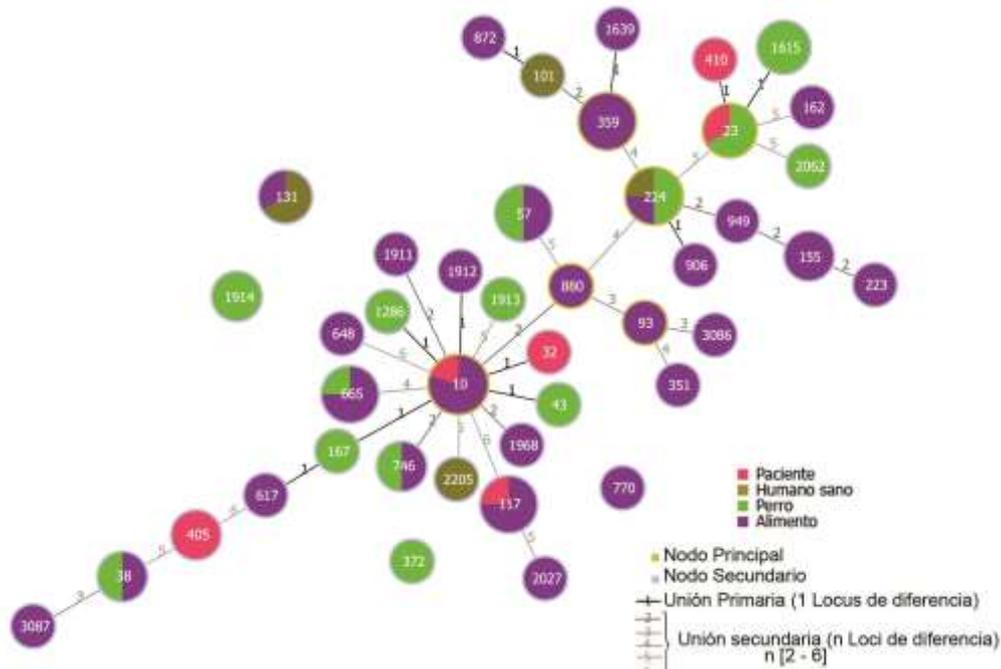
Con respecto a los STs libres o Singletons, este esquema Full goeBURST reduce la cantidad a aquellos que presentan más de 6 loci diferentes, es decir, sin ninguna similitud. En este caso sólo hay cuatro Singletons ST131, ST1914, ST732 y ST770.

En conclusión: hay cuatro SCC dentro de todos los STs estudiados (SCC10, SCC224, SCC23 y SCC359 y SCC93) y solo cuatro Singletons, el resto, de una u otra forma, están relacionados entre sí. ST880 se puede considerar como Subcomplejo clonal de SCC10 y nodo nexo entre SCC10 y SCC224.

Así que, aun existiendo gran diversidad de STs, hay pocos que se no se puedan asociar entre sí, aunque las relaciones de la mayoría sean débiles (entre 4 y 6 loci diferentes).

El estudio y distribución de la secuencia tipo de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en función de su origen, grupo filogenético y tipo de BLEE se presentarán a continuación en esquemas de relación completa (Esquemas Full goeBURST).

## 4.4.2.1 SECUENCIAS TIPO Y ORIGEN



**Figura 31** Esquema Full goeBURST que relaciona los STs obtenidos en función del origen de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.

Como se puede observar en la figura 31, 9 de las 39 STs detectadas en este estudio (23%) fueron identificadas en cepas de *E. coli* de más de un ecosistema diferente: humanos y alimentos (ST117, ST10, ST131), humanos y perros (ST23), perros y alimentos (ST38, ST57, ST665 y ST746) y humanos, perros y alimentos (ST224).

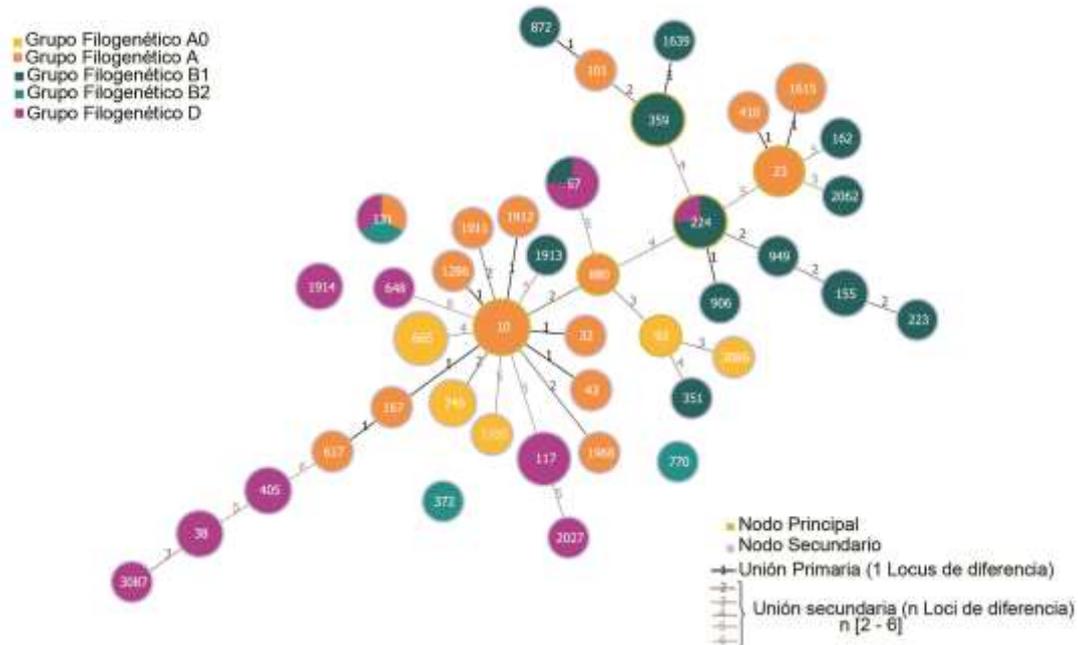
De los cuatro Singletons detectados, dos de ellos corresponden a cepas de perros, uno a cepas de alimentos y el ST131 lo podemos encontrar tanto en cepas de personas sanas como de alimentos.

Por otro lado, en cuanto a los complejos clonales definidos detectados, éstos son heterogéneos, y SCC10 presenta cepas de los cuatro orígenes, SCC224 presenta cepas de origen alimentario, de perro y de personas sanas, SCC23, de alimentos, pacientes y perros y SCC359 solo dos aislados: persona sana y alimento. Si nos fijamos en el SCC93, todas las cepas de este complejo clonal son de alimentos.

Los STs de cepas fecales de pacientes, aun siendo una muestra pequeña, se concentran dentro de los complejos clonales SCC10 y del SCC23.

#### 4.4.2.2 SECUENCIAS TIPO Y GRUPOS FILOGENÉTICOS

La relación entre los grupos filogenéticos y las secuencias tipo se puede ver en la figura 32.

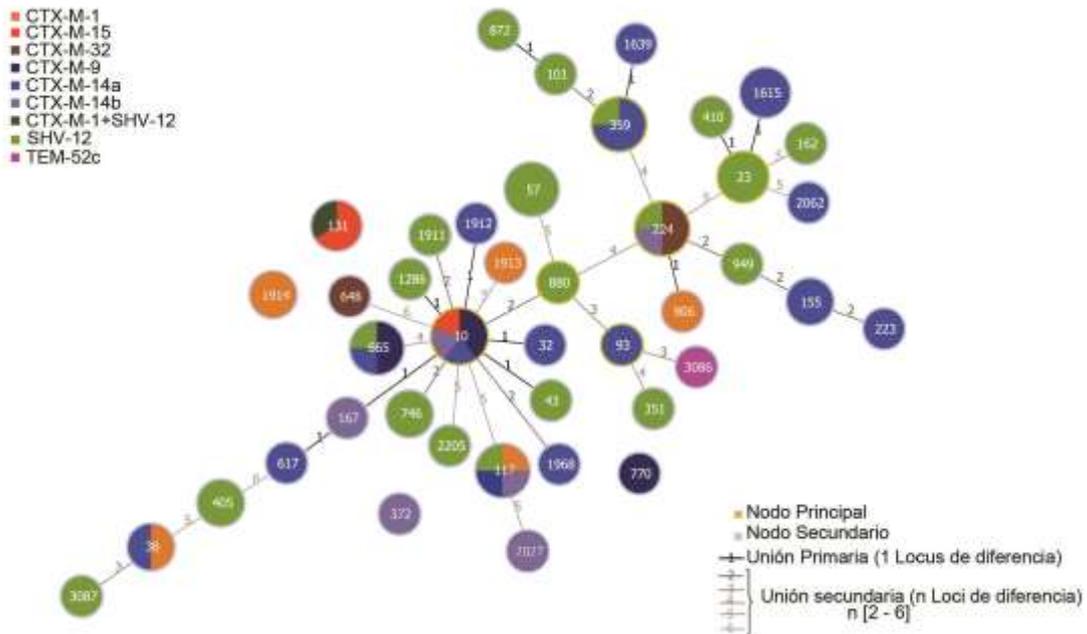


**Figura 32** Esquema Full goeBURST que presenta la relación entre Secuencias Tipo y Grupos filogenéticos.

Podemos observar el predominio de algunos grupos filogenéticos en determinados complejos clonales. En SCC10 el grupo filogenético predominante fue el A y el segundo grupo en frecuencia fue el D. En el caso del complejo clonal SCC224, el grupo B1 fue predominante y los complejos SCC23 y SCC359 se asocian mayoritariamente a los grupos filogenéticos A y B1.

Se ha detectado una alta diversidad de STs entre las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes y es de interés destacar la detección de cepas con un determinado ST que presentaban diferentes grupos filogenéticos. Cabe destacar el caso del singleton ST131 que engloba cepas adscritas a tres grupos filogenéticos diferentes (A, B2 y D).

4.4.2.3 SECUENCIAS TIPO Y VARIANTE BLEE



**Figura 33** Esquema Full goeBURST que presenta la relación entre BLEEs y Secuencias Tipo.

Los complejos clonales SCC23 y SCC359 presentaron cepas que tenían solo dos tipos de BLEEs, SHV-12 y CTX-M-14a. El complejo SCC10 se ha detectado en cepas productoras de seis BLEEs diferentes, siendo SHV-12 y CTX-M-14a las mayoritarias. También es interesante observar que las CTX-M-9 identificadas se localizan en cepas correspondientes al complejo SCC10 al singleton ST770.

Todas las cepas productoras de CTX-M-15, menos una, se engloban dentro de la secuencia tipo ST131.

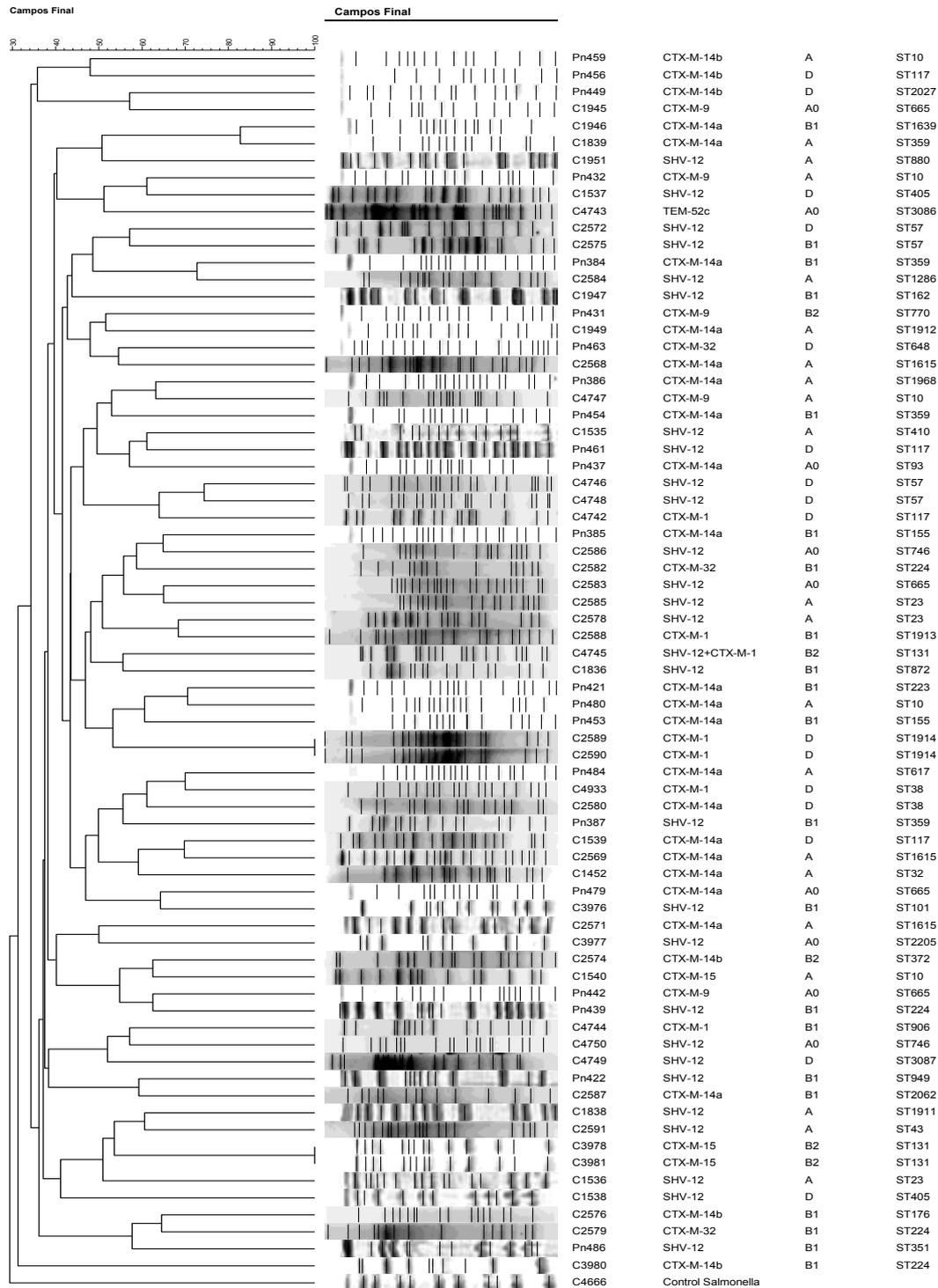


## Resultados

La figura 34 representa el análisis filogenético molecular realizado mediante comparación de las secuencias de los 7 genes del MLST aplicando el método de Máxima Verosimilitud (ver [sección 3.17](#)).

En este árbol, realizado por cambios en la secuencia de ADN, muestra cuatro agrupaciones definidas, asociadas claramente a los complejos clonales establecidos por los esquemas Full goeBURST, excepto SCC93, que lo engloba dentro de SCC10. El ST770 es presentado en el árbol claramente diferenciado del resto de STs, y el esquema Full goeBURST lo presenta como un singleton.

### 4.4.4 COMPARACIÓN DE PATRONES DE PFGE



**Figura 35** Dendrograma generado por comparación de los patrones de PFGE-SmaI de las 72 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de diferentes orígenes (personas sanas y pacientes, perros y alimentos).

En la figura 35 se presenta el dendograma de los perfiles obtenidos por PFGE con las 72 cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes. Se identifica una gran variedad de perfiles de campos pulsados (en concreto 70 perfiles diferentes entre las 72 cepas), indicando una elevada diversidad clonal. La excepción fue dos cepas productoras de la enzima CTX-M-15 (aisladas de muestras fecales de personas sanas) y dos cepas con la CTX-M-1 (aisladas de muestras fecales de perros) que presentaron patrones de PFGE indistinguibles.

#### 4.5 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LAS CEPAS AISLADAS EN LOS DIFERENTES ORÍGENES

Un resumen de los resultados más significativos se presenta en la Tabla 33

**Tabla 33** Resultados significativos de las diferentes pruebas estadísticas realizadas ( $p < 0,05$ )

Prueba	Variable	Variable comparada	Estadístico	P-value
<b>Independencia</b>	<b>CTX-M</b>	<b>Origen</b>		
	CTX-M-15	Humano	$\chi^2$ de independencia	0,007
	Plásmidos	Origen		
	IncFIA	Humano	$\chi^2$ de independencia	0,000
<b>Contraste de Hipótesis</b>	<b>BLEE</b>	<b>Grupos Filogenéticos</b>		
	CTX-M-1	D	Test exacto de Fisher	0,039
	CTX-M-15	B2	Test exacto de Fisher	0,036
	<b>BLEE</b>	<b>Resistencias</b>		
	CTX-M-15	gentamicina	Test exacto de Fisher	0,030
	CTX-M-15	tobramicina	Test exacto de Fisher	0,030
	CTX-M-9	trimetoprim-sulfametoxazol	Test exacto de Fisher	0,014
	CTX-M-14b	trimetoprim-sulfametoxazol	Test exacto de Fisher	0,006
	<b>BLEE</b>	<b>Integrones</b>		
	CTX-M-9	Integrón Clase 1	Test exacto de Fisher	0,006
	<b>BLEE</b>	<b>Plásmidos</b>		
	CTX-M-1	IncI1	Estadístico de Yates	0,043
	CTX-M-15	IncX	Test exacto de Fisher	0,001
		IncFIA	Test exacto de Fisher	0,003
		IncI1	Test exacto de Fisher	0,012
	CTX-M-9	IncHI2	Test exacto de Fisher	0,022
		IncFIC	Test exacto de Fisher	0,036
CTX-M-14a	IncI1	$\chi^2$ de Pearson	0,004	
SHV-12	IncI1	Test exacto de Fisher	0,000	
<b>Quinolonas</b>	<b>Otros Ab no beta-lactámicos</b>			
Ác. nalidíxico	tetraciclina	Test exacto de Fisher	0,018	

#### 4.5.1 NORMALIDAD

Todas las variables que se estudiaron fueron sometidas al test de normalidad de **Índice Kormogonov-Smirnov** con un p-value de 0,05. Todas dieron resultados significativos, de forma que ninguna variable se ajusta a una distribución normal y los contrastes de hipótesis deberán ser no paramétricos.

##### Independencia

Todas las variables estudiadas fueron sometidas al test de independencia mediante **la prueba de  $\chi^2$  de independencia** asumiendo una probabilidad de significancia estadística del 5 % (p-value=0,05).

Estudiando las variables que arrojaron resultados significativos, CTX-M-15 se encuentra ligada al origen Humanos Sanos (p-value=0,003) pero aunque estadísticamente sea un resultado correcto, el tamaño de la muestra para este tipo de mecanismo de resistencia es pequeño en el conjunto por lo que habría tomar estos resultados con cautela.

#### 4.5.2 COMPARACIÓN DE VARIANZAS U HOMOGENEIDAD.

Todas las variables para las que se deberían aplicar las pruebas no paramétricas fueron evaluadas mediante la **Prueba de Levene**.

El resultado comparando las variables con los orígenes agrupados (personas y animales considerando las muestras de alimentos englobadas dentro de las animales), de las 40 variables, 16 presentaron un valor significativo en la prueba, de forma que éstas (estreptomycin, sulfamidas, ácido nalidíxico, ciprofloxacino, B1, B2, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14a, integrasa de tipo 2, repN, repW, repP, repFIC, repFII y repB/O) fueron comparados con cada uno de los orígenes.

Así pues, en Pacientes, las variables que son modificadas por éste origen y pueden influir en los test posteriores son estreptomycin, sulfamidas, ácido nalidíxico, B1, repW, repP, repFIC, y repB/O. En Humanos sanos tenemos, ciprofloxacino, B2, CTX-M-14a y repFII. En Alimentos las variables son sulfamidas, ácido nalidíxico, B1, CTX-M-9, CTX-M-14a, repN, repP, repFIC, repFII y repB/O. Y en Perros, sulfamidas, ciprofloxacino, CTX-M-9, integrasa de tipo 2, repN, repW, repP y repFI.

Estos resultados hay que tenerlos en cuenta en el momento que se deba interpretar algún resultado posterior.

### 4.5.3 CONTRASTE DE HIPÓTESIS

Los resultados significativos desde el punto de vista estadístico se presentan en la tabla 33.

En esta tabla se observa, con una significancia estadística definida mediante un  $p$ -value  $<0,05$  una relación estadísticamente reseñable entre CTX-M-15 y la presencia de resistencia a gentamicina, tobramicina pero se descarta su relación con las fluoroquinolonas por un margen muy estrecho ( $p$ -value = 0,056). El grupo filogenético B2 y replicones IncX ( $p$ -value = 0,001), IncFIA ( $p$ -value = 0,003 ) e IncI1 ( $p$ -value = 0,012 ), si tienen una relación significativa con CTX-M-15.

En cuanto a las BLEEs del grupo CTX-M-9, la CTX-M-14a tiene una relación inversa con el replicón IncI1, es decir que la presencia de esta BLEE se asocia significativamente con la ausencia del citado replicón. Por otro lado, la CTX-M-9 y 14b tienen una relación significativa directa con la presencia de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol; conviene recordar que estos genes *bla* habitualmente se localizan dentro del transposón tipo In60, algo corroborado con la relación directa entre la CTX-M-9 y la presencia de Integrón de Clase 1. Además, la variante CTX-M-9 se asocia significativamente con los replicones IncHI2 e IncFIC.

La BLEE SHV-12 está fuertemente relacionada con la presencia del replicón IncI1 ( $p$ -value=0,000).

El resto de variables definidas y que no se presentan en la tabla 33, no arrojaron un valor estadísticamente significativo, siempre y cuando se tengan en cuenta posibles influencias (falta de independencia, falta de homocedasticidad). La asociación CTX-M-14a y el replicón IncK no fue estadísticamente significativa, aunque su valor fue muy cercano al valor de corte ( $p$ : 0,053).

Estas no relaciones estadísticas no implican que no existan relaciones empíricas reseñables.

#### 4.5.4 COMPARACIÓN ENTRE POBLACIONES

Se han comparado las diferentes variables en las cepas de origen humano versus las de origen animal (incluyendo en este grupo las de alimentos), descartando aquellas variables dependientes indicadas en el [apartado 4.5.2](#). No se ha observado ninguna asociación significativa ( $p\text{-value} \geq 0,05$ ) entre estas variables analizadas en función del origen humano o animal de las mismas.



-- Los recién llegados a Arrakis subestiman con frecuencia la importancia que tiene el agua --dijo Kynes mirando a Jessica--. Ya sabéis, debemos tener en cuenta la Ley del Mínimo.

Jessica se dio cuenta por el tono de voz que aquellas palabras encerraban una prueba y respondió:

-- El crecimiento está limitado por la necesidad del elemento que se encuentra en menor cantidad. Y, naturalmente, la condición menos favorable es la que controla la tasa de crecimiento.

**Dune**

*--Frank Herbert*

## DISCUSIÓN

*"Sin duda, no hay progreso"*

*--Charles Darwin*



## 5 DISCUSIÓN

---

Las BLEEs y en concreto las CTX-M, tras su aparición en 1986 y su difusión inicial, se han convertido en un problema creciente (Pitout, 2010; Cantón *et al.*, 2008; Pitout and Laupland, 2008; Livermore *et al.*, 2007) y han demostrado presentar una gran capacidad adaptativa en cuanto a extensión, diversidad y especies hospedadoras. Si bien en un primer momento se encuadró el problema en un ámbito exclusivamente clínico (Bonnet, 2004; Bradford, 2001), fuera de dicho ambiente y además en nichos muy diversos, como personas, animales, alimentos o muestras ambientales (Diallo *et al.*, 2013; Cantón *et al.*, 2012; Ewers *et al.*, 2012; EFSA, 2011; Guenther *et al.*, 2011).

La situación actual define un escenario que podría calificarse como pandemia, tanto a nivel geográfico como a nivel de nicho ecológico (Livermore, 2012), de forma que los estudios que se están llevando a cabo podrán arrojar más datos sobre las características de los hospedadores bacterianos de estas enzimas y con ello, más información útil para poder controlar el problema que están planteando. Uno de los conceptos que se deberá abordar, y que cada vez se tiene más en consideración es el aspecto de la co-resistencia y de los diferentes niveles jerárquicos genéticos donde se pueden encuadrar los genes *bla*. Estos niveles se pueden identificar como nivel base, el gen *bla* y los elementos de inserción (ISs) que se encuentran alrededor del mismo, un segundo nivel como los transposones y transposones complejos que los pueden albergar y los integrones, un tercer nivel como los plásmidos que pueden portar estas estructuras y ya un cuarto y último, las cepas hospedadoras. Estos niveles estarían definidos en función de su complejidad, de forma que cada uno aporta unas capacidades como puedan ser movilización y expresión, mantenimiento y propagación del gen *bla* (Cantón *et al.*, 2012).

Este panorama demanda de un conocimiento tanto de las estructuras y cepas como de los nichos ecológicos donde se pueden localizar bacterias portadoras de estas enzimas, de forma que en este trabajo i) se ha analizado la diversidad y frecuencia de BLEEs en cepas de *E. coli* de diferentes ambientes de La Rioja (personas sanas y pacientes, animales y alimentos) y se ha determinado el contenido de las cepas en genes

de resistencia, integrones y plásmidos; ii) se ha analizado las líneas genéticas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> circulantes en los ambientes estudiados y las correlaciones entre ellas.

En una primera etapa se analizó la diversidad de BLEEs y sus entornos genéticos entre los **aislados clínicos** de *E. coli* CTX<sup>R</sup> obtenidos en el Hosp. San Pedro de Logroño en un periodo de 3 años (2004-2007), así como también se determinaron de los grupos filogenéticos de de dichos aislados.

Es importante destacar que un elevado porcentaje de los aislados clínicos CTX<sup>R</sup> fueron portadores de BLEEs (73,5 %). La producción de BLEEs es el mecanismo mas frecuentemente implicado en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (como es el caso de la cefotaxima) en los aislados de *E. coli*, tanto en nuestro estudio como en otros estudios de la literatura (Briongos-Figuero *et al.*, 2012; Voets *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2010). Hay que destacar que la resistencia a cefotaxima también puede ser ocasionada por hiper-producción de la beta-lactamasa cromosómica AmpC intrínseca de *E. coli* (por mutaciones en el promotor del gen cromosómico *ampC*) o por la expresión de beta-lactamasas plasmídicas de tipo AmpC (como es el caso de CMY-2) (Jacoby, 2009) no se pudo descartar la implicación de estos dos mecanismos señalados en el fenotipo CTX<sup>R</sup> en las cepas BLEE-negativo de este estudio.

Por otro lado, es importante reseñar que la mayor parte de los aislados clínicos BLEE<sup>+</sup> correspondían a pacientes de la comunidad y a infecciones urinarias. Otros autores señalan asimismo la elevada asociación de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> con el ámbito comunitario y con las infecciones urinarias (Doi *et al.*, 2013; Rodríguez-Baño *et al.*, 2008a), aspectos que hacen pensar en la diseminación de este tipo de cepas resistentes en ecosistemas extrahospitalarios. Datos similares han sido obtenidos en diversos estudios multicéntricos realizados por el Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) en el 2002, 2004 y 2006 (Díaz *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2003), el que más se aproxima a nuestros datos corresponde al realizado en 2006, que informa de un 67,2 % de cepas comunitarias (Díaz *et al.*, 2009). Este aumento sostenido de las cepas extra hospitalarias puede significar la existencia de una serie factores externos que favorecen la presencia de *E. coli*-BLEE<sup>+</sup>, además de la propia presión selectiva que crea el ambiente hospitalario. Uno de esos factores podría ser la acción directa de la co-resistencia.

Si observamos los fenotipos de resistencia de las 72 aislados clínicos BLEE<sup>+</sup>, existe un elevado porcentaje de los mismos (65 %) que presentan multiresistencia

(bacterias MDR, recordemos que se define como la resistencia al menos a tres familias de antibióticos). Teniendo en cuenta el criterio de selección de estas cepas y la batería de antimicrobianos utilizados, todos los aislados son resistentes al menos a una familia, los beta-lactámicos, pero el porcentaje de aislados MDR es alto y puede apoyar la idea de co-selección (Cantón *et al.*, 2012), como herramienta de competición positiva y de fijación de ecotipos (Cohan, 2001).

En cuanto al tipo de BLEEs detectadas en las cepas de *E. coli* del ámbito hospitalario, se detectan mayoritariamente BLEEs del tipo CTX-M (86%) y en menor medida del tipo SHV (14 %) y no se detectan BLEEs del tipo TEM. En el último estudio multicéntrico español publicado también se refleja el predominio de CTX-M (72%) seguido de SHV (26,8 %) y muy minoritariamente de TEM (1,2 %) (Díaz *et al.*, 2010) Si nos fijamos en las variantes de BLEEs, en las cepas clínicas de esta tesis se han detectado mayoritariamente CTX-M-14 (variantes a y b), seguidas de SHV-12 y de CTX-M-9. Datos similares han sido también reportados en los estudios multicéntricos anteriormente señalados (Díaz *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2005) distribución igualmente señalada por otros autores al hacer referencia a la situación de las BLEEs y concretamente a las CTX-M (Hawkey and Jones, 2009; Cantón *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008a; Bonnet, 2004). En cuanto a la evolución de las BLEEs en nuestro estudio, la SHV-12 se mantiene presente y creciente a lo largo del periodo analizado, mientras que las variantes de CTX-M presentan cambios en cuanto a su aparición y distribución. En este sentido, las variantes CTX-M-14 y CTX-M-9, han fluctuado en los años del estudio manteniendo su importancia relativa dentro de las variantes CTX-M. Un aspecto importante es la ausencia de CTX-M-15 en los dos primeros años del estudio (2004-2005) y su emergencia en los dos años siguientes (2006-2007), con una evolución creciente. La emergencia de CTX-M-15 se ha detectado asociada a la emergencia del clon CTX-M-15-B2-ST131 entre nuestros aislados. CTX-M-15, como representante del grupo 1 de CTX-M, detectada por primera vez en 1999 en Nueva Delhi (Karim *et al.*, 2001), es un tipo de BLEE que ha experimentado una diseminación global asociada a su inclusión en el clon ampliamente epidémico ST131-B2 (Cantón *et al.*, 2012; Hawkey and Jones, 2009; Coque *et al.*, 2008b; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). La evolución de las diferentes variantes CTX-M puede estar también relacionada con los estructuras genéticas que se encuentran rodeando al gen o que lo movilizan. El gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> se ha descrito ligado a un integrón

de tipo 1 clásico y formando una estructura compleja conocida como trasposón In60 (Sabaté *et al.*, 2002), mientras que el gen *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> posee la secuencia de inserción *ISEcp1* justo delante.

Es interesante remarcar la identificación de una variante de CTX-M que forma parte del grupo CTX-M-9, es la CTX-M-67, una enzima que se diferencia de CTX-M-14 en un aminoácido y que solo ha sido descrita previamente en un aislado en España (Oteo *et al.*, 2008) y que presenta el mismo entorno genético que el gen de la enzima CTX-M-14 (variante a).

En cuanto a los grupos filogenéticos en nuestras cepas clínicas BLEE<sup>+</sup>, el más frecuente fue el filogrupo A, seguido del B2 y D, siendo el B1 minoritario. El grupo filogenético A fue también el más frecuentemente detectado en un estudio previo entre 92 aislados clínicos de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> obtenidos en 11 hospitales españoles (Oteo *et al.*, 2009) En el estudio de Machado *et al.*, 2005 los grupos filogenéticos B2 y D fueron los mas frecuentes (66 %) entre los aislados clínicos de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.

CTX-M-15 se ha visto claramente ligada a cepas de *E. coli* del grupo B2 y de la secuencia tipo ST131 y el serotipo O25b, en cepas que con frecuencia albergan otras beta-lactamasas como TEM-1 y OXA-1. Este ecotipo originario de la India, empezó a detectarse desde el 2004 en varios países (Seiffert *et al.*, 2013; Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Lavollay *et al.*, 2006), siendo su primera referencia en España entre 2004 – 2005 (Oteo *et al.*, 2006). Las cepas de este clon albergan asimismo un gen de resistencia frente a aminoglucósidos (*acc(6')-Ib-cr*), que confiere también una baja resistencia también a quinolonas. (Dolejska *et al.*, 2012; Pallecchi *et al.*, 2007).

Si nos centramos en el grupo mayoritario de beta-lactamasas, CTX-M-14, vemos que se encuentran representados tres de los cuatro grupos filogenéticos de forma importante (A, B2 y D). El origen clínico de las cepas puede hacer pensar que la presencia de B2 y D sea lógica, ya que habitualmente estos grupos se asocian a infecciones extraintestinales (Johnson *et al.*, 2001) y la presencia del grupo filogenético A puede ser más inusual, aunque se está viendo la aparición de un clon inicialmente asociado al grupo filogenético D, clon denominado clonal group A (CGA), que en principio no tiene nada que ver con el grupo filogenético A, que presenta un fenotipo ACSSuTTp (siendo ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfamidas, tetraciclinas y trimetoprim) y a una secuencia tipo concreta (ST69) en otros grupos filogenéticos y

encontrándose una asociación bastante significativa con la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) (Johnson *et al.*, 2011), además de localizarse en cepas con CTX-M-14 (Valverde *et al.*, 2009). Entre las cepas del hospital pertenecientes al grupo filogenético A, que portasen CTX-M-14 y que presentasen resistencia al SXT, se han identificado 10 de las 14 cepas. No se dispone de datos claros para saber si estas cepas pueden pertenecer al grupo CGA, pero algunas características fenotípicas coinciden con el mismo aunque habría que realizar una caracterización mas profunda de las mismas.

Una vez conocida la diversidad de BLEEs entre los aislados clínicos, el siguiente paso fue estudiar la prevalencia de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> entre los **aislados fecales de pacientes** (del mismo hospital en el que se habían analizado las cepas clínicas) y de **personas sanas** así como también de animales de compañía (*Canis lupus familiaris*). Las muestras fecales de todos estos orígenes fueron analizados de forma homogénea con el objetivo de poder comparar los resultados.

En esta tesis se ha detectado que el 7 % y el 4 % de los pacientes y de las personas sanas estudiadas, respectivamente, eran portadoras fecales de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. En Alemania, la prevalencia en pacientes fue del 10 % (Reuland *et al.*, 2013) mientras que en Suecia se han aportado datos de no más de un 5 % en 2010 (Strömdahl *et al.*, 2011). En estudios previos realizados en España, ese porcentaje de prevalencia oscila entre 7,7 % en pacientes y una prevalencia de un 31,1 % en pacientes directamente relacionados con brotes referentes a intoxicaciones alimenticias (Mesa *et al.*, 2006) en el 2003. En un estudio donde se moniorizaba a familiares de pacientes ingresados por infecciones urinarias, se detectó una prevalencia alta en sus muestras fecales (27,4 % que conviven y 15,6 % en familiares que no conviven con el paciente en un periodo entre 2005-2006 (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008b). Este mismo estudio utilizó un grupo control de personas sanas relacionadas con centros sanitarios, dando una prevalencia del 7,4 %, dato parecido al obtenido en un estudio de personas sanas en el 2007 donde se obtuvo una prevalencia del 7,7 % (Vinué *et al.*, 2009).

En un estudio llevado a cabo en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid con muestras fecales de pacientes intra y extrahospitalarios, se evidencia una evolución creciente en la frecuencia de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en 2003 (11,8 y 5,5 %, respectivamente) respecto a 1991 (0,3 y 0,7 %, respectivamente) (Valverde *et al.*, 2004). En un estudio llevado a cabo en 2007 por el mismo grupo se detectó una frecuencia superior en el

estado de portador de BLEEs (8,2 %) (Paniagua *et al.*, 2010). La prevalencia en individuos sanos detectada por este grupo fue del 3,7 % (Valverde *et al.*, 2004). Otros grupos también han detectado una evolución creciente en la frecuencia de colonización fecal por *E. coli* BLEE<sup>+</sup>, por ejemplo en niños sanos de Perú y Bolivia en 2005 (1,7 %) respecto a 2001 (0,1 %) (Pallecchi *et al.*, 2007). Frecuencias en torno al 7% han sido también detectadas en personas sanas en estudios previos en España y en Túnez (Ben Sallem *et al.*, 2012; Vinué *et al.*, 2009). En un estudio de prevalencia llevado a cabo en 2001-2004 en Portugal en voluntarios sanos, se detectó una frecuencia de colonización por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> del 1,8 % (Machado *et al.*, 2013) en niños sanos del 2,7 % (Guimaraes *et al.*, 2009).

En esta tesis se ha detectado una prevalencia fecal de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> del 16 % en **perros** de la perrera municipal de La Rioja. Se trataba de animales aparentemente sanos, muchos de los cuales habían sido utilizados en actividades cinegéticas y la toma de muestras se realizó justo antes de proceder a la eutanasia de dichos perros. En estudios previos que se han llevado a cabo en perros sanos, la prevalencia de animales con cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> fue del 10,2 % en 2003 en Portugal (Costa *et al.*, 2004), el 6,1 % entre 2001 y 2003 en Italia (Carattoli *et al.*, 2005b), el 16,6 % en 2008 en China (Sun *et al.*, 2010) y el 5,8 % en 2009 en Japón. Datos similares de frecuencia de detección fecal de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> fue detectado en perros y gatos en Túnez en un estudio previo (17,5 %) (Ben Sallem *et al.*, 2013). Los datos de prevalencia detectados en esta tesis en perros se asemeja los datos obtenidos en China y en Túnez (Ben Sallem *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2010). Las cepas de los estudios citados fueron obtenidas de perros de clínicas veterinarias donde los animales se habían llevado para vacunación. Todos estos valores de prevalencia son altos si los comparamos con los obtenidos en humanos, incluso más altos que los obtenidos en pacientes. Los estudios llevados a cabo en Italia y Portugal (Costa *et al.*, 2004) son algo menores aunque hay que tener en cuenta que las muestras se analizaron en 2003 en ambos estudios, aspecto que puede influir en esta menor prevalencia.

Cuando se analizó la contaminación de **alimentos** de origen animal por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> se evidenció que el 11 % de las muestras analizadas eran positivas, pero este porcentaje fue superior cuando solo se consideraron las muestras derivadas de pollo (25%). Además, se evidenció un incremento en el porcentaje de muestras de pollo

contaminadas por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en 2011 (50 %) respecto a 2007-2009 (21,5 %). Existen otros dos estudios llevados a cabo en España sobre contaminación de alimentos por *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. Uno de ellos realizado en Sevilla donde se detectó este tipo de microorganismos resistentes en el 97 % de las muestras analizadas y además se identificó una muestra de pavo portadora de CTX-M-15, adscrita al grupo filogenético A (Egea *et al.*, 2012) El segundo estudio se llevó a cabo en Navarra, y se detectó un 71% de muestras de alimentos con *E. coli* BLEE<sup>+</sup> (Ojer-Usoz *et al.*, 2013) Se han llevado a cabo numerosos estudios en otros países sobre contaminación por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en alimentos y también se han realizado numerosos estudios sobre colonización fecal por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en animales de consumo, con valores muy variables en función del tipo de animal o muestra de alimento, de la metodología usada y del país; no obstante, en la mayor parte de los estudios los valores oscilan entre el 0,5-40 % (EFSA, 2011; Briñas *et al.*, 2005; Briñas *et al.*, 2003). En Portugal se detectó un 14,7 % de muestras de alimentos de origen cárnico contaminadas por *E. coli* BLEE<sup>+</sup> (Machado *et al.*, 2008).

En un estudio llevado a cabo en España sobre la frecuencia de BLEEs entre los aislados fecales de *E. coli* de pollos de matadero (aislados en placas no selectivas), se detectó que el 1,6% de los aislados de *E. coli* obtenidos en 2000- 2001 eran portadores de BLEEs y este porcentaje ascendió al 5% entre los aislados de 2003, evidenciándose una clara tendencia creciente en relación a este tipo de resistencia en animales de consumo (Briñas *et al.*, 2005; Briñas *et al.*, 2003).

Los altos porcentajes encontrados en nuestro estudio en alimentos cárnicos (especialmente en pollos) es algo preocupante, porque son datos obtenidos a partir de muestras destinadas directamente al consumo humano (compradas en carnicerías y grandes superficies) decir, es carne manipulada en los mataderos y que debe pasar un estándar de limpieza, control de calidad y una cadena de frío estipulada por las Autoridades Sanitarias. Así pues, es muy fácil pensar que los porcentajes en los pollos vivos han de ser mayores a los encontrados en los alimentos, algo que queda patente en un estudios previos como el realizado en granjas avícolas en Portugal (40 %) (Costa *et al.*, 2009).

Es de destacar la ausencia de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en las muestras de alimentos procedentes de especies cinegéticas. Se trata de animales de vida libre que no ha

recibido antibióticos. Esto hace pensar en el efecto que puede tener el uso de antibióticos en animales de producción, especialmente en los de cría intensiva, como es el caso de los pollos y los cerdos.

En los últimos años ha habido importantes cambios regulatorios referentes al **uso de antibióticos** en alimentación animal. En este sentido, desde 2006 está prohibido el uso de estos antibióticos como promotores del crecimiento animal en los países de la Unión Europea, aunque sí que pueden ser utilizados con fines terapéuticos o profilácticos. En animales de cría intensiva, como los pollos o los cerdos, el uso de antibióticos con fines profilácticos es aún elevado y puede estar contribuyendo a la co-selección de bacterias multi-resistentes como es el caso de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. En este sentido, con frecuencia se usan antibióticos como las tetraciclinas o las sulfamidas con tal fin, y el uso de estos antibióticos puede contribuir a la co-selección de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>, que con frecuencia es resistente también a estos antibióticos. Otro aspecto relevante en la diseminación de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en las granjas de pollos y cerdos es el hacinamiento en el que con frecuencia se crían estos animales que favorecen enormemente la dispersión y diseminación de dichas bacterias (EFSA, 2011) Otra cuestión está relacionada con la ventaja adaptativa que puede llegar a proporcionar alguno de los elementos estudiados dentro de ambiente donde la temperatura media es mayor a 37° C, que puede favorecer la persistencia y diseminación de determinadas estructuras genéticas (Cantón *et al.*, 2012).

Una cuestión que nos podríamos plantear es cual es el consumo de antibióticos, y en concreto de beta-lactámicos en nuestro país en el ámbito extrahospitalario. En España, la dosis diaria definida por 1000 habitantes (DHD) ha disminuido un valor de 0,6 DHD, de un 19,3 DHD a un 18,7 DHD en el consumo de antibiótico extra hospitalario generales (Adriaenssens *et al.*, 2011) durante los años en los que se realizó el estudio de pacientes del Hospital San Pedro. Los datos en estos años (2005 – 2006) sobre antibióticos sistémicos beta-lactámicos J01C y J01D, (código ATC [http://www.whooc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=J&showdescription=yes](http://www.whooc.no/atc_ddd_index/?code=J&showdescription=yes)), en cuanto a DHD, son de 11, 7 y 11,5 respectivamente, valores muy altos, teniendo un peso muy importante las penicilinas de amplio espectro y las combinaciones de penicilinas con inhibidores IRT (Versporten *et al.*, 2011b). Y si nos fijamos en las cefalosporinas J01D, son 1,8 DHD y 1,7 DHD pesando claramente las cefalosporinas de segunda generación y apoyadas por las de tercera (Versporten *et al.*, 2011a). Todos los datos

presentados por España son datos de reembolso, es decir, datos obtenidos a partir de las recetas devueltas (y abonadas) a la Tesorería de la Seguridad Social, por tanto no tienen en cuenta la venta de antibióticos fuera de este ámbito, así pues se puede intuir que ese valor es mayor aún.

Una de las cuestiones que se han estado barajando sobre la prevalencia de estas cepas es la cuestión de la **co-resistencia**, la presencia de diferentes determinantes que confieren resistencia frente a distintos antibióticos y que el uso de unos favorece la presencia y mantenimiento de resistencia para todos (Andersson and Hughes, 2010). Los genes de resistencia a antibióticos pueden estar implicados en muy variados mecanismos de resistencia (enzimas modificantes, bombas de expulsión etc), y estos genes pueden estar incluidos en estructuras tipo integrones, los cuales pueden ser movilizados en plásmidos que pueden contener múltiples genes de resistencia a los antibióticos.

En las cepas obtenidas en los diferentes orígenes se realizó una búsqueda de genes que confiriesen resistencia frente a tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas o aminoglucósidos, entre otros, localizados tanto fuera como dentro de integrones. La alta presencia de fenotipo de resistencia frente a ácido nalidíxico y ciprofloxacino podía implicar modificadores en la diana, la presencia de genes *qnr* o ambos mecanismos. No se detectó ningún gen *qnr*, así que la explicación de esa resistencia se centra en la modificación de la diana en los genes *gyrA* y *parC*.

Otro grupo de genes estudiados fueron los relacionados con la resistencia a tetraciclinas, identificándose los determinantes *tet(A)* y *tet(B)* en cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de todos los orígenes, observando una pauta continua de mayor frecuencia de *tet(A)* que *tet(B)*. Los genes identificados y responsables de la resistencia a diferentes antibióticos de la familia de los aminoglucósidos fueron *aac(3')-I* y *aph(3')-Ia*, detectados en cepas de perros y alimentos, y *aac(3')-IV* identificado en cepas de alimentos. Otro gen relacionado con la resistencia a los aminoglucósidos fue *aac(6')-Ib-cr*, detectado en cepas humanas. El gen *sul2* está relacionado con la resistencia a las sulfamidas y fue detectado y localizado fuera del integrón, tanto en cepas de perros como en alimentos, incluso en cepas que ya portaban el gen *sul1* por la presencia de integrones, datos ya observados por otros autores (Frye and Jackson, 2013).

Un estudio llevado a cabo en 2009 en Francia en 36 hospitales de la zona del Loria en cepas de *E. coli* aisladas del tracto urinario y de sangre ha revelado una

relación directa entre la presencia de resistencia a quinolonas y la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, y además destacan una asociación entre resistencia a quinolonas y tetraciclinas (Batard *et al.*, 2013). Las cepas estudiadas en esta tesis destacan porque la mayoría presentan, independientemente del origen, fenotipos de resistencia frente a quinolonas (ácido nalidíxico sobre todo) y la resistencia a tetraciclinas. Del total de las cepas en esta tesis, más del 80 % presentaban resistencia al ácido nalidíxico y de éstas, el 64 % también eran resistentes a ciprofloxacino y en todas las cepas NAL<sup>R</sup> se ha detectado al menos un gen de resistencia frente a la tetraciclina, genes reportados anteriormente (McMurry *et al.*, 1980). Esta resistencia a la quinolona, normalmente es debida a una mutación en el gen *gyrA* y suele ser el primer paso hacia la resistencia a las fluoroquinolonas. El que se observe esa relación, hace pensar en que la presencia de un plásmido que porte algún determinante de resistencia a tetraciclinas de tipo bomba de eflujo (*tet(A)*, *tet(B)* por ejemplo), pueda generar alguna ventaja a dicha cepa. Pero quizás la pregunta ahora no es ¿cómo se da esta asociación? sino ¿por qué se da?, ¿qué ventaja proporciona? No se puede descartar la posibilidad de co-selección dado el alto uso de la tetraciclina en ciertos ámbitos como es el caso de los animales, como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, también nos queda fijarnos en la ecología y la evolución, en la fitness de este tipo de bacterias.

Existen estudios que definen los diferentes pasos que se dan en *E. coli* hasta presentar una alta resistencia a las quinolonas. Estos se centran en mutaciones cromosómicas consecutivas en los genes *gyrA*, *marR*, y *parC*. También se ha visto que la primera mutación implica un coste evolutivo a la bacteria, de forma que se activan mecanismos para intentar solucionar este problema y uno de ellos es el de generar mutaciones compensatorias (Björkman *et al.*, 2000). La presencia de las bombas de eflujo proporcionadas por los genes *tet* pueden actuar disminuyendo el coste ecológico impuesto por las mutaciones de *gyrA* y *marR* de la bacteria y facilitar así la aparición de las mutaciones compensatorias necesarias (Andersson and Hughes, 2010). La presencia y mantenimiento de genes BLEE fuera de medios donde exista una presión selectiva, teniendo en cuenta que son genes normalmente localizados en plásmidos y de expresión constitutiva, debe generar una bajada de fitness en la bacteria portadora, pero su mantenimiento debe ser porque su presencia genera algún tipo de ventaja más allá de la co-resistencia, puede que actúen a modo de bypass metabólico o puede actuar equilibrando otros costes como pueda ser el mantenimiento de integrones.

El tercer aspecto definido, los **integrones**, se puede decir que de las tres clases de integrones descritos que incluyen genes de resistencia a los antibióticos, solo se han detectado dos clases (clase 1 y clase 2), siendo los integrones de clase 2 detectados en las cepas de animales o de alimentos y los de clase 1 encontrados en cepas de todos los orígenes analizados. Además, se han identificado integrones de clase 1 tanto clásicos como defectivos. Si nos fijamos en los integrones defectivos, se han identificado en cepas de todos los orígenes y los genes localizados en su región variable han sido siempre los mismos y en el mismo orden (*dfrA16+aadA2; estX+psp+aadA2+cmlA+aadA+qacH+IS440+sul3*).

La presencia de estas estructuras que permiten acumular múltiples genes de resistencia puede incrementar la respuesta frente a situaciones de estrés y así favorecer las cepas portadoras. En los integrones clásicos detectados en nuestras cepas se han identificado 5 estructuras de regiones variables diferentes, observándose mayor heterogeneidad en las cepas procedentes de animales o de alimentos. Una de estas estructuras (*dfrA16* y *aadA2*) se ha detectado en todos los orígenes y se ha identificado siempre en cepas portadoras de las enzimas CTX-M-14b, CTX-M-9 o SHV-12, de forma que se ve relación de este tipo de región variable con las BLEEs mencionadas. Estos genes de resistencia forman parte del transposón complejo In60 (Sabaté *et al.*, 2002). El resto de estructuras localizadas en la región variable del integrón se han detectado en cepas de algunos de los orígenes analizados. Los integrones de clase 1 con un único gen en la región variable (*aadA*), se han detectado en las cepas de origen animal, igual que los integrones con los genes *dfrA1* y *aadA1*, mientras que la estructura que presenta *dfrA17* y *aadA5*, se han encontrado solo en las cepas de origen humano y más concretamente solo en las cepas portadoras de CTX-M-15. Todos estos genes localizados en la región variable del integrón clásico confieren resistencia frente a trimetoprim y estreptomicina, antibióticos que se han utilizado desde hace tiempo en personas y en animales.

Estas estructuras de región variable se han encontrado en *E. coli* en estudios previos (Sáenz *et al.*, 2010; Vinué *et al.*, 2009; Vinué *et al.*, 2008b; Cocchi *et al.*, 2007) pero la variedad de determinantes dentro de la región variable ha sido algo mayor que la encontrada en esta tesis. Las cepas de humanos sanos en Portugal (Machado *et al.*, 2013) presentan regiones variables de integrones de clase I similares a las identificadas en nuestras cepas fecales de humanos sanos y de pacientes.

El mantenimiento de una estructura compleja como la de los integrones solo se da dentro de una bacteria si le genera una ventaja adaptativa frente al resto dentro del nicho y si la bacteria ha sido capaz de gestionar el coste evolutivo que implica mantener esa estructura. Si bien la primera forma de compensar ese coste extra, y a priori la más simple, es eliminar los genes no útiles tras la desaparición de la presión selectiva, no siempre es la elegida por este tipo de bacterias ya que se ha visto la persistencia de diferentes elementos que confieren resistencia una vez que la bacteria ya no crece en presencia de ese antimicrobiano, siendo la co-selección un evento importante en esta acción, sobre todo en cepas que han asentado integrones en su interior (Dang *et al.*, 2006; Enne *et al.*, 2001). Pero previa a esta co-selección, la bacteria ha debido buscar la forma de mantener estructuras complejas como los plásmidos portadores de integrones. Para ello la cepa ha debido desarrollar mutaciones compensatorias, bien en el propio plásmido, bien en el cromosoma, que disminuyan el coste evolutivo que representa tener ese integrón. Una vez conseguido, el integrón realiza su trabajo de mantenimiento y reorganización de genes de resistencia según el ambiente en el que se encuentre (Cambray *et al.*, 2010). Estos cambios se presentan como cinco pasos: primero que se hayan dado mutaciones cromosómicas independientes de la presencia de estos plásmidos, segundo que se generen cambios adaptativos en el cromosoma bacteriano que disminuya la carga evolutiva que implica mantener el plásmido, tercero que se den cambios adaptativos en el propio plásmido de forma que implique una mejora competitiva frente a otros plásmidos presentes en la célula, cuarto cambios que repercutan ya directamente en la fitness de la bacteria mejorándola y quinto cambios tanto en el cromosoma como en el plásmido que los interrelacione (Björkman and Andersson, 2000).

Las BLEEs detectadas en los distintos ambientes fueron diferentes variantes de CTX-M y una sola variante de SHV y de TEM (SHV-12, CTX-M-1, CTX-M-32, CTX-M-15, CTX-M-9, CTX-M-14a y CTX-M-14b, y TEM-52). Además de estas beta-lactamasas, se detectaron e identificaron beta-lactamasas de espectro reducido como TEM-1 y OXA-1. En este aspecto hay que destacar la gran dispersión de las BLEEs en las muestras estudiadas. La presencia de SHV-12 es constante en todos los nichos, mientras que las CTX-M, dependiendo del grupo, las encontramos en uno u otro ambiente. En todas las muestras estudiadas, el grupo de las CTX-M-1 presentó tres variantes, las cuales se distribuyeron entre las cepas humanas y las no humanas, de

forma que CTX-M-15 se ha encontrado en muestras fecales de pacientes, en clínica y en humanos sanos mientras que CTX-M-1 y CTX-M-32 se han localizado en cepas de heces de perros y en alimentos, siendo CTX-M-32 obtenida en la única muestra de cerdo que presentó fenotipo BLEE. El estudio realizado de la evolución del grupo CTX-M-1 define como primer BLEE surgida a partir del ancestro común la enzima CTX-M-3, en vez de la enzima CTX-M-1. Ambas se identificaron en humanos pero si bien CTX-M-15 desciende directamente de CTX-M-3 por un cambio aminoacídico, han de darse hasta 5 para obtener CTX-M-1. Por otro lado, CTX-M-32 es descendiente directa de CTX-M-1 (Novais *et al.*, 2010). Así pues, se puede considerar como dos evoluciones independientes dentro del grupo y viendo que los datos presentados implican una separación de nichos, el estudio estadístico liga solo la presencia de CTX-M-15 a origen humano ( $p=0,007$ ), de forma que no podemos decir que las variantes 1 y 32 estén ligadas al resto de orígenes.

En el estudio de las cepas clínicas, la única BLEE obtenida del grupo CTX-M-1 fue CTX-M-15, el ecotipo B2-ST131 y la fecha de aparición fue en el 2006. Las CTX-M-15 identificadas en humanos sanos también fueron identificadas como pertenecientes a ese ecotipo ya que eran B2-ST131, mientras que la aislada a partir de muestras fecales de pacientes fue una cepa A-ST10 sin fenotipo ACSSuTTP. El identificar cepas del ecotipo B2-ST131 en humanos sanos nos informa de una gran adaptabilidad y dispersión del mismo, aspecto de interés dado la capacidad epidémica de dicho clon (Novais *et al.*, 2012; Leflon-Guibout *et al.*, 2008; Pallecchi *et al.*, 2007; Oteo *et al.*, 2006; Rodríguez-Baño *et al.*, 2004). Otro aspecto que conviene considerar, es que si se estos determinantes puede no ser excesivamente costoso para la bacteria y potencialmente podría constituir un problema en una microbiota intestinal asentada, ya que se ha visto en experimentos de conjugación que podían ser transferidos (Naseer *et al.*, 2009).

Las BLEEs del grupo CTX-M-9, han sido más abundantes en cantidad respecto a las del grupo CTX-M-1. La variante 14a ha sido una CTX-M ubicua, presentando también una gran variedad de fenotipos de resistencia y detectándose en cepas de todos los grupos filogenéticos, encontrándose en un caso en una cepa B2 y siendo la mayoría de los grupos A y B1. En cuanto a la variante CTX-M-9 se ha detectado en las cepas alimentarias y en las clínicas, aunque en el estudio de cepas clínicas se detectó un

declive de esta variante a favor de CTX-M-14a. La variante CTX-M-14b se circunscribe a ambientes no clínicos, detectándose en alimentos, perros y personas sanas.

Es interesante remarcar que se han detectado 8 cepas portadoras de BLEEs del grupo CTX-M-9 y con el fenotipo de resistencia ACSSuTTP, cuatro de origen alimentario y otras cuatro de origen canino. En alimentos, estas cepas ACSSuTTP portaban la variante CTX-M-9 ó CTX-M-14b, variantes cuyos genes han sido detectados en el transposón In60. En el caso de perros, la mayoría de cepas portaban la variante CTX-M-14a (tres de cuatro) pero portaban también integrones de clase 1 clásicos. Con la excepción de una cepa alimentaria que pertenecía al grupo filogenético D, las 7 cepas restantes pertenecían al grupo filogenético mayoritario A (5 A, 2 A0).

La variante de BLEE SHV-12, se ha detectado de forma constante en cepas de todos los orígenes, y las cepas que las portaban han presentado una peculiaridad con respecto a los integrones defectivos de clase 1. Del total de cepas de *E. coli* BLEE+ en las que se ha estudiado la presencia de integrones, en 12 cepas se han detectado integrones de clase 1 de tipo defectivo, y en 10 de dichas cepas se identificó la presencia de SHV-12. Este tipo de integrón lleva en su interior una alta cantidad de determinantes de resistencia a antibióticos, de forma que las cepas que lo portan son cepas multirresistentes.

Los genes de BLEEs detectados en las cepas fecales de personas sanas y enfermas, alimentos y perros presentaron los mismos entornos a los detectados en las cepas clínicas. Estas estructuras se encuentran bastante asentadas ya que son similares a los descritos en otros estudios previos en cepas de diversos orígenes (Diestra *et al.*, 2009; Vinué *et al.*, 2009; Vinué *et al.*, 2008a;). Aunque los elementos anteriores al gen *bla* en si son diferentes (*ISEcp1*, *ISCRI*), ambos son elementos de inserción que favorecen la diseminación de estas beta-lactamasas y toda esta estructura no es nada difícil que se ubique dentro de otros elementos mayores como puedan ser transposones (In60 donde se puede encontrar *ISCRI* y *bla*<sub>CTX-M-9</sub>) y plásmidos, e incluso integrarse dentro del cromosoma (Cantón *et al.*, 2012).

Las estructuras superiores donde se pueden localizar todos los genes anteriormente mencionados son los plásmidos o en el cromosoma. Si nos centramos en los **plásmidos**, todas las cepas han presentado más de un replicón, de forma que la cantidad de “herramientas competitivas” que presentan estas cepas son variadas. En estudios donde se han localizado las diferente beta-lactamasas en plásmidos, se ha

asociado los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en plásmidos con grupo de incompatibilidad IncFII, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncK y *bla*<sub>SHV-12</sub> en los del grupo de incompatibilidad IncII (Diestra *et al.*, 2009, Coque *et al.*, 2008b). En estudio se han encontrado replicones de estos grupos en cepas portadoras de las BLEEs referidas, aunque no se puede saber si estos plásmidos los portan ya que no se han realizado ensayos de hibridación con sondas específicas.

A partir del tipado molecular de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes realizado, se han detectado 39 secuencias tipo diferentes y 70 patrones de corte diferentes. Claramente se observa una amplia y gran diversidad de clones entre las cepas portadoras, algo esperado en una especie tan ubicua como es *E. coli* y lo que indica que la diseminación de BLEEs no se debe a la dispersión de un clon sino a la inclusión de plásmidos portadores de genes de BLEEs en muy diversos clones bacterianos.

Las cepas fueron asimismo tipadas en cuanto a su grupo filogenético. En este sentido, conviene centrarse en el desdoblamiento del grupo filogenético A en A y A0 propuesto por Branger y colaboradores (2005) a partir de la técnica y resultados de Clermont *et al.* 2000. En el trabajo de Branger, clasifica cada resultado de la técnica de PCR de forma más pormenorizada asignando a cada resultado de la multiplex un nombre. Esta clasificación inicialmente separaba A en A1 y A0, tomando A0 como la ausencia de amplificación de los tres marcadores (Branger *et al.*, 2005), La novedad sobre esta diferenciación consiste en que A0, basándonos en otros estudios (Gordon *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2001), tiene carácter propio como grupo independiente y eso es un paso más a partir del desglose de Branger, afinando como grupos coherentes los denominados B1, B2 y D y desglosando A en A y A0, aunque en otros estudios A0 se identifica como E (Gordon *et al.*, 2008).

Considerado esto, al ser una clasificación diferente de la consenso, es interesante apuntar que una gran cantidad de cepas A0 se han identificado en cepas aisladas de pollo, pero también se han detectado en muestras fecales de perros y personas sanas. Del total de cepas con grupo filogenético A (ya que según las clasificaciones que se pueden observar en diferentes artículos que sigan la técnica ampliamente utilizada de PCR, los englobarán ahí directamente), el 30 % de las cepas son A0. Las beta-lactamasas localizadas son CTX-M-9, CTX-M-14a, SHV-12 y la única TEM-52c y los STs a los que pertenecen son [ST(número de cepas)]: ST665(4), ST746(2), ST93(1),

ST2205(1) y ST3086(1). Excepto ST93 y ST3086, el resto tiene una relación más o menos fuerte con el SCC10.

A través de los esquemas goeBURST y de los árboles filogenéticos, se han podido detectar 4 complejos clonales claros en las cepas de los orígenes estudiados (humano, animal y alimentario) que presentan una gran diversidad a nivel molecular y 4 singletons. Además se han identificado siete nuevos STs a lo largo de esta tesis: ST1911, ST1912, ST1913, ST1914, ST1968, ST2027, ST2205, ST3086 y ST3087.

Los ST más frecuentes en las cepas aisladas han sido ST10, ST57, ST117, ST224, ST359 y ST665.

Según la base de datos <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo.html>, base de datos que recoge las aportaciones de la comunidad científica y que por supuesto se encuentra muy incompleta, el ST10 ha sido identificado en cepas aisladas de ganado bovino, perros, humanos, cerdos, pollos (alimento y animal), camellos, palomas, loros, conejos, suelo y agua, una gran variedad de orígenes y en nuestro estudio se ha detectado en alimentos derivados del pollo y en muestras fecales de pacientes. El ST57 se ha aislado en un leopardo y muestras de pollo (animal) y en el marco de esta tesis se ha identificado en alimentos (pollo) y en un paciente. El ST117 se ha detectado en muestras de tipo aviar (pollo y alimentos derivados), gato, humanos y en muestras de agua y en nuestras cepas se ha detectado en alimentos (pollo) y en un paciente. El ST224 en humanos solo, siendo por el contrario el más variado hasta el momento en nuestro estudio ya que se ha encontrado en alimentos (pollo), perros y en una persona sana. El ST359 se ha encontrado en humanos y patos domésticos y en este estudio todos son de alimento (pollo). Por último, el ST665 se ha identificado en berberechos crudos y durante esta tesis este ST se ha localizado en cepas aisladas de alimentos (pollo) y de perros.

Otro dato interesante es la uniformidad que se observa en casi todos estos STs respecto a los grupos filogenéticos a los que se adscriben. En este sentido, todas las cepas ST10 pertenecen al grupo filogenético A, la mayoría de ST57 pertenece al grupo filogenético D, todos los ST117 están también adscritos a D, el ST224 está englobado en el grupo filogenético B1 ST359 pertenece al grupo filogenético B1 y ST665 ha sido encontrado enteramente en cepas pertenecientes al grupo filogenético A0.

La comparación de resultados obtenidos en las muestras fecales de pacientes, personas sanas y muestras obtenidas de alimentos de origen aviar nos presenta una serie de relaciones como la alta presencia de replicones que definen los grupos de incompatibilidad IncI1, IncF<sub>rep</sub>, IncFIA, IncFIA, y la frecuencia de los grupos filogenéticos A, A0 y B1. Las BLEEs compartidas de forma mayoritaria han sido CTX-M-14a y SHV-12. Estos datos, apoyados por la falta de clusters segregados en el análisis de PFGE, informa de un alto intercambio de elementos genéticos entre cepas cuando se localizan en el mismo entorno. Los ST comunes se engloban en tres de los cuatro complejos clonales definidos, y la concordancia empíricamente vista entre ST y grupo filogenético en las cepas implicadas pueden sugerir que se de un asentamiento efectivo de cepas de origen aviar en el sistema digestivo humano (Kluytmans *et al.*, 2013; Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

A lo largo de esta tesis se ha puesto en evidencia la gran diseminación de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en ámbitos no clínicos, correspondientes a clones muy diversos, existiendo reservorios de dichos microorganismos en la microbiota intestinal de personas y de animales y los alimentos pueden ser un vehículo importante para su transferencia al hombre. Es necesario profundizar en el estudio de los factores que pueden estar contribuyendo a esta diseminación global de *E. coli* BLEE<sup>+</sup>. Es posible que además del uso de antibióticos en humanos y en animales existan otros factores que también estén contribuyendo a este fenómeno y su determinación será clave para poder controlar este grave problema que tanta repercusión tiene en salud humana y animal.



Por supuesto, los ciudadanos de Ankh-Morpork siempre mantenían que el agua del río era increíblemente pura. Cualquier agua que hubiera pasado por tantos riñones, razonaban, tenía que ser pura a la fuerza.

**Rechicero**

**--Terry Pratchett**

## CONCLUSIONES

*“La imaginación es más importante que el conocimiento”*

*--Albert Einstein*



## 6 CONCLUSIONES

---

1.- Existe una amplia diseminación de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en distintos ecosistemas (ambiente hospitalario, personas sanas, animales o alimentos).

2.- La mayor parte de las cepas clínicas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> corresponden a aislados de la comunidad (67 %) y fundamentalmente son de origen urinario (75 %).

3.- Las variantes de BLEEs mayoritarias en las cepas clínicas de *E. coli* fueron CTX-M-14 (65 %), seguida de SHV-12 (15 %) y CTX-M-9 (12 %). A partir de 2006 comienza a detectarse el clon CTX-M-15-B2-ST131. Los grupos filogenéticos mayoritarios en estas cepas fueron el A, B2 y D.

4.- Se observa una moderada frecuencia de detección de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en muestras fecales de personas sanas (4 %) y de pacientes hospitalizados (7 %). Las variantes de BLEEs detectadas fueron SHV-12, CTX-M-14 (variantes a y b) y CTX-M-15. La detección del clon CTX-M-15-B2-ST131 en heces de personas sanas indica su diseminación fuera del ámbito hospitalario y la posibilidad de que existan otros reservorios no definidos.

5.- El perro (*Canis lupus familiaris*) podría ser un reservorio de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> (detección en el 16 % de las muestras analizadas), que podría transmitir a las personas en contacto con los mismos. Las variantes de BLEEs más frecuentemente detectadas fueron SHV-12 (40 %), CTX-M-14 (35 %, variantes a y b), y en menor medida CTX-M-1 (15 %) y CTX-M-32 (10 %).

6.- Los alimentos derivados del pollo frecuentemente están contaminados con cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> (25 %), detectándose de manera mayoritaria las variantes CTX-M-14 y SHV-12 (75 %) y otras variantes de forma minoritaria (CTX-M-9, CTX-M-1, CTX-M-32 y TEM-52). Se observa un incremento en la frecuencia de detección en 2011 (50 %) respecto a 2007-2009 (21 %). Las carnes de otros orígenes están infrecuentemente contaminadas con *E. coli* BLEE<sup>+</sup>.

7.- La mayor parte de las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes presentaron un fenotipo de multiresistencia. La alta presencia de integrones (>50 % de las cepas) favorece dicho fenotipo de multiresistencia, destacando una moderada

## Conclusiones

presencia de integrones defectivos (17 %), localizados en su mayoría en cepas aisladas del ecosistema animal.

8.- Se evidencia una gran diversidad clonal entre los aislados de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de todos los orígenes. El 23 % de los STs detectados fueron identificados en más de un ecosistema analizado y los STs mayoritarios fueron ST10, ST359, ST57, ST665, ST224, ST117, ST131 y ST23. Los aislados se agruparon en 4 complejos clonales principales (SCC10, SCC23, SCC224 y SCC359) y 4 singletones, siendo ST131 uno de ellos.

9.- Las cepas de origen clínico fueron mayoritariamente de los grupos filogenéticos A, B2 y D y las comensales de personas, animales y alimentos de los grupos filogenéticos A y B1. Dentro del grupo filogenético A se han detectado cepas de diferentes STs con fenotipo ACSSuTTp y con una relación importante con el transposón In60 y las variantes CTX-M-9 y CTX-M-14b.

10.- Se observan diversas asociaciones con significación estadística como presencia de CTX-M-1 y grupo filogenético D y replicon IncI1, también entre CTX-M-15, grupo filogenético B2 y resistencia a aminoglucósidos y por último, entre CTX-M-9 e integrones de clase 1.

11.- Las cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> de los diferentes orígenes contienen una gran diversidad de replicones. La presencia de los plásmidos que los contienen puede ayudar a la movilización y dispersión de los genes *bla*.

12.- La diseminación de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en diferentes ecosistemas se debe más a la diseminación de plásmidos en muy diversos clones bacterianos que a la dispersión clonal.

13.- La diseminación de cepas de *E. coli* BLEE<sup>+</sup> en muy diversos ecosistemas hace pensar en múltiples factores que pueden estar contribuyendo a la distribución y mantenimiento de estos genes. El estudio de todos estos factores será crucial para comprender la evolución y dinámica de esta resistencia.

# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

---

**Adriaenssens, N., Coenen, S., Versporten, A., Muller, A., Minalu, G., Faes, C., Vankerckhoven, V., Aerts, M., Hens, N., Molenberghs, G., Goossens, H., Group, E.P.,** 2011. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe (1997-2009). *J Antimicrob Chemother* 66 Suppl 6, vi3-12.

**Ambler, R.P.,** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289, 321-331.

**Andersson, D.I., Hughes, D.,** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8, 260-271.

**Batard, E., Ollivier, F., Boutoille, D., Hardouin, J.-B., Montassier, E., Caillon, J., Ballereau, F.,** 2013. Relationship between hospital antibiotic use and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *International Journal of Infectious Diseases* 17, e254-e258.

**Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., Liebana, E.,** 2005. *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1319-1322.

**Becket, E., Tse, L., Yung, M., Cosico, A., Miller, J.H.,** 2012. Polynucleotide Phosphorylase Plays an Important Role in the Generation of Spontaneous Mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194, 5613-5620.

**Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M.M., Vedel, G., Nénot, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G.,** 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett* 120, 75-80.

**Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Estepa, V., Jouini, A., Gharsa, H., Klibi, N., Sáenz, Y., Ruiz-Larrea, F., Boudabous, A., Torres, C.,** 2012. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, 1511-1516.

**Ben Sallem, R., Gharsa, H., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Sáenz, Y., Boudabous, A., Torres, C.,** 2013. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(2), 98 - 102.

**Bennett, P.M.,** 2004. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* 266, 71-113.

**Bennett, P.M.**, 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S347-357.

**Björkman, J., Andersson, D.I.**, 2000. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resistance Updates* 3, 237-245.

**Björkman, J., Nagaev, I., Berg, O.G., Hughes, D., Andersson, D.I.**, 2000. Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* 287, 1479-1482.

**Bonnet, R.**, 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1-14.

**Bradford, P.A.**, 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14, 933-951, table of contents.

**Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H.V., Gouriou, S., Picard, B., Denamur, E.**, 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase type. *Emerg Infect Dis* 11, 54-61.

**Briñas, L.**, 2005. Caracterización genética de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* de origen animal, humano y alimentario. In, Departamento de Agricultura y Alimentación, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Vol. Doctor. Universidad de La Rioja, City.

**Briñas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Sáenz, Y., Porrero, M.C., Domínguez, L., Torres, C.**, 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1262-1264.

**Briñas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Domínguez, L., Torres, C.**, 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2056-2058.

**Briñgos-Figuero, L.S., Gómez-Traveso, T., Bachiller-Luque, P., Domínguez-Gil González, M., Gómez-Nieto, A., Palacios-Martín, T., González-Sagrado, M., Dueñas-Laita, A., Pérez-Castrillón, J.L.**, 2012. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *International Journal of Clinical Practice* 66, 891-896.

**Bush, K., Jacoby, G.A.**, 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 969-976.

**Cambray, G., Guerout, A.M., Mazel, D.**, 2010. Integrons. *Annu Rev Genet* 44, 141-166.

- Cantón, R., Coque, T.M.**, 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9, 466-475.
- Cantón, R., Gonzalez-Alba, J.M., Galan, J.C.**, 2012. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* 3, 110.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M.**, 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1, 144-153.
- Carattoli, A.**, 2009. Resistance plasmid families in **Enterobacteriaceae**. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2227-2238.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J.**, 2005a. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63, 219-228.
- Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A.**, 2005b. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 833-835.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E.**, 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555-4558.
- Clermont, O., Gordon, D.M., Brisse, S., Walk, S.T., Denamur, E.**, 2011. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ Microbiol* 13, 2468-2477.
- Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.C.**, 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50, 126-132.
- Cohan, F.M.**, 2001. Bacterial species and speciation. *Syst Biol* 50, 513-524.
- Coque, T.M., Baquero, F., Cantón, R.**, 2008a. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill* 13.
- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Cantón, R., Nordmann, P.**, 2008b. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 14, 195-200.
- Coque, T.M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F., Cantón, R.**, 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 46, 500-510.
- Costa, D., Poeta, P., Briñas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J., Torres, C.**, 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 54, 960-961.

**Costa, D., Vinué, L., Poeta, P., Coelho, A.C., Matos, M., Sáenz, Y., Somalo, S., Zarazaga, M., Rodrigues, J., Torres, C., 2009.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol* 138, 339-344.

**Chopra, I., Roberts, M., 2001.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.

**Dang, H., Song, L., Chen, M., Chang, Y., 2006.** Concurrence of cat and tet genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China. *Microb Ecol* 52, 634-643.

**Decousser, J.W., Poirel, L., Nordmann, P., 2001.** Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A beta-lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3595-3598.

**Diallo, A.A., Brugère, H., Kérourédan, M., Dupouy, V., Toutain, P.-L., Bousquet-Mélou, A., Oswald, E., Bibbal, D., 2013.** Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. *Water Research* 47, 4719-4729.

**Díaz, M.A., Hernández-Bello, J.R., Rodríguez-Baño, J., Martínez-Martínez, L., Calvo, J., Blanco, J., Pascual, A., 2010.** Diversity of *Escherichia coli* Strains Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Spain: Second Nationwide Study. *J Clin Microbiol* 48, 2840-2845.

**Díaz, M.Á., Hernández, J.R., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Baño, J., Pascual, Á., (GEIH), 2009.** *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27, 8.

**Diestra, K., Juan, C., Curiao, T., Moya, B., Miro, E., Oteo, J., Coque, T.M., Perez-Vazquez, M., Campos, J., Canton, R., Oliver, A., Navarro, F., Red Espanola de Investigacion en Patologia Infecciosa, S., 2009.** Characterization of plasmids encoding *bla*<sub>ESBL</sub> and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 63, 60-66.

**Doi, Y., Park, Y.S., Rivera, J.I., Adams-Haduch, J.M., Hingwe, A., Sordillo, E.M., Lewis, J.S., Howard, W.J., Johnson, L.E., Polsky, B., Jorgensen, J.H., Richter, S.S., Shutt, K.A., Paterson, D.L., 2013.** Community-Associated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 56, 641-648.

**Dolejska, M., Brhelova, E., Dobiasova, H., Krivdova, J., Jurankova, J., Sevcikova, A., Dubska, L., Literak, I., Cizek, A., Vavrina, M., Kutnikova, L., Sterba, J., 2012.** Dissemination of IncFIIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing **Enterobacteriaceae** isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *Int J Antimicrob Agents* 40, 510-515.

**Drawz, S.M., Bonomo, R.A.**, 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23, 160-201.

**Eckert, C., Gautier, V., Saladin-Allard, M., Hidri, N., Verdet, C., Ould-Hocine, Z., Barnaud, G., Delisle, F., Rossier, A., Lambert, T., Philippon, A., Arlet, G.**, 2004. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1249-1255.

EFSA, 2011. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 9, 95.

**Egea, P., López-Cerero, L., Torres, E., Gómez-Sánchez Mdel, C., Serrano, L., Navarro Sánchez-Ortiz, M.D., Rodríguez-Bano, J., Pascual, A.**, 2012. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *Int J Food Microbiol* 159, 69-73.

**Enne, V.I., Livermore, D.M., Stephens, P., Hall, L.M.**, 2001. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357, 1325-1328.

**European Centre for Disease Prevention and Control ECDC**, 2013. Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2010, 1 - 125.

**Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., Wieler, L.H.**, 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 646-655.

**Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J.**, 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2, 40-61.

**Fischbach, M.A., Sonnenburg, J.L.**, 2011. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell Host Microbe* 10, 336-347.

**Francisco, A.P., C. Vaz, P. T. Monteiro, J. Melo-Cristino, M. Ramirez, Carriço., J.A.**, 2012. PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 13, 10.

**Frye, J.G., Jackson, C.R.**, 2013. Genetic Mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Front Microbiol* 4.

**Garcillán-Barcia, M.P., Alvarado, A., de la Cruz, F.**, 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* 35, 936-956.

**Giske, C.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Cantón, R., Walsh, T.R.**, 2009. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 63, 1-4.

- Griggs, D.J., Gensberg, K., Piddock, L.J.**, 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1009-1013.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E., Dalsgaard, A.**, 2000. Distribution and *in-vitro* transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 49, 929-936.
- Guenther, S., Ewers, C., Wieler, L.H.**, 2011. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Front Microbiol* 2.
- Guimaraes, B., Barreto, A., Radhouani, H., Figueiredo, N., Gaspar, E., Rodrigues, J., Torres, C., Igrejas, G., Poeta, P.**, 2009. Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates and vancomycin-resistant enterococci in fecal samples of healthy children. *Microb Drug Resist* 15, 211-216.
- Hawkey, P.M., Jones, A.M.**, 2009. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 64 Suppl 1, i3-10.
- Hernández, J.R., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Coque, T.M., Pascual, A., Spanish Group for Nosocomial, I.**, 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2122-2125.
- Hernández, J.R., Pascual, Á., Cantón, R., Martínez-Martínez, L., (GEIH)**, 2003. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21, 6.
- Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., Philippon, A.**, 2002. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3045-3049.
- Jacoby, G.A.**, 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22, 161-182.
- Johnson, J.R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A.L.**, 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 183, 78-88.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.C.**, 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* 6, e1000793.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., Nordmann, P.**, 2001. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 201, 237-241.

**Kelly, B.G., Vespermann, A., Bolton, D.J.**, 2009. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* 47, 951-968.

**Kluytmans, J.A.J.W., Overdeest, I.T.M.A., Willemsen, I., Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q., van der Zwaluw, K., Heck, M., Rijnsburger, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Savelkoul, P.H.M., Johnston, B.D., Gordon, D., Johnson, J.R.**, 2013. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors. *Clinical Infectious Diseases* 56, 478-487.

**Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K.**, 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 118, 1-36.

**Lartigue, M.F., Poirel, L., Nordmann, P.**, 2004. Diversity of genetic environment of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *FEMS Microbiol Lett* 234, 201-207.

**Lavollay, M., Mamlouk, K., Frank, T., Akpabie, A., Burghoffer, B., Ben Redjeb, S., Bercion, R., Gautier, V., Arlet, G.**, 2006. Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2433-2438.

**Leflon-Guibout, V., Blanco, J., Amaqdouf, K., Mora, A., Guize, L., Nicolas-Chanoine, M.H.**, 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol* 46, 3900-3905.

**Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J.M., Mevius, D.J., on behalf of the national, E.s.g.**, 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 873-880.

**Levesque, C., Roy, P.H.**, 1993. PCR analysis of integrons. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (Eds.), *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington D. C., pp. 590-594.

**Livermore, D.M.**, 2012. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *Korean J Intern Med* 27, 128-142.

Livermore, D.M., Cantón, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59, 165-174.

**Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C., Peixe, L.**, 2013. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons and sul genes in Portugal. *Front Microbiol* 4.

**Madsen, L., Aarestrup, F.M., Olsen, J.E.**, 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella Typhimurium*. *Vet Microbiol* 75, 73-82.

**Maharjan, R.P., Gaffé, J., Plucain, J., Schliep, M., Wang, L., Feng, L., Tenaillon, O., Ferenci, T., Schneider, D.**, 2013. A case of adaptation through a mutation in a tandem duplication during experimental evolution in *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 14, 441.

**Mahillon, J., Chandler, M.**, 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 725-774.

**Martinez, J.L.**, 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* 276, 2521-2530.

**Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J.**, 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3214-3221.

**Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J.**, 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1568-1574.

**McMurry, L., Petrucci, R.E., Jr., Levy, S.B.**, 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3974-3977.

**Mella, S.M., Acuña, G., Muñoz, M., Pérez, C., J., L., Gonzalez, G., Bello, H., M., D., R., Z.**, 2000. Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. *Rev Chil Infec* 17, 53 - 66.

**Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F.**, 2006. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 58, 211-215.

**Naseer, U., Haldorsen, B., Tofteland, S., Hegstad, K., Scheutz, F., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., The Norwegian Esbl Study, G.**, 2009. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS* 117, 526-536.

**Navia, M.M., Ruiz, J., Sánchez-Céspedes, J., Vila, J.**, 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 46, 295-298.

**Nei, M., Kumar, S.**, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 333.

Ng, L.K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A., Johnson, W., 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 3018-3021.

Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Canica, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J., Johnson, J.R., 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61, 273-281.

Novais, Â., Comas, I., Baquero, F., Cantón, R., Coque, T.M., Moya, A., González-Candelas, F., Galán, J.-C., 2010. Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* 6, e1000735.

Novais, Â., Viana, D., Baquero, F., Martinez-Botas, J., Canton, R., Coque, T.M., 2012. Contribution of IncFII and broad-host IncA/C and IncN plasmids to the local expansion and diversification of phylogroup B2 *Escherichia coli* ST131 clones carrying blaCTX-M-15 and qnrS1 genes. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2763-2766.

Ojer-Usoz, E., González, D., Vitas, A.I., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles-Casquero, A., Escolano, M.d.I.S., 2013. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 93, 316-321.

Olivares Pacheco, J.A., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, M.B., Martínez, J.L., 2013. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* 4.

Olson, A.B., Silverman, M., Boyd, D.A., McGeer, A., Willey, B.M., Pong-Porter, V., Daneman, N., Mulvey, M.R., 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2112-2115.

Orr, H.A., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10, 531-539.

Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Rodriguez, M.C., Velasco, M., Saavedra, J.M., Perez-Vazquez, M., Garcia-Cobos, S., Martinez-Martinez, L., Campos, J., 2008. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 32, 534-537.

Oteo, J., Diestra, K., Juan, C., Bautista, V., Novais, Â., Pérez-Vázquez, M., Moyá, B., Miró, E., Coque, T.M., Oliver, A., Cantón, R., Navarro, F., Campos, J., 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 34, 173-176.

- Oteo, J., Navarro, C., Cercenado, E., Delgado-Iribarren, A., Wilhelmi, I., Orden, B., García, C., Miguelanez, S., Pérez-Vazquez, M., García-Cobos, S., Aracil, B., Bautista, V., Campos, J., 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J Clin Microbiol* 44, 2359-2366.
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M., 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of **Enterobacteriaceae** from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 41, 4264-4269.
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Kronvall, G., Paradisi, F., Rossolini, G.M., 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2720-2725.
- Paniagua, R., Valverde, A., Coque, T.M., Baquero, F., Cantón, R., 2010. Assessment of prevalence and changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing **Enterobacteriaceae** fecal carriers using a chromogenic medium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67, 376-379.
- Park, C.H., Robicsek, A., Jacoby, G.A., Sahm, D., Hooper, D.C., 2006. Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3953-3955.
- Partridge, S.R., 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 35, 820-855.
- 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.
- Pitout, J.D., 2010. Infections with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing **Enterobacteriaceae**. *Drugs* 70, 313-333.
- Pitout, J.D., Thomson, K.S., Hanson, N.D., Ehrhardt, A.F., Moland, E.S., Sanders, C.C., 1998. beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1350-1354.
- Pitout, J.D.D., Laupland, K.B., 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing **Enterobacteriaceae**: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 8, 159-166.
- Poirel, L., Kämpfer, P., Nordmann, P., 2002. Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 4038-4040.

- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H.G., Tims, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., 2012.** Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Environ Microbiol*.
- Reuland, E.A., Overdeest, I.T., Al Naiemi, N., Kalpoe, J.S., Rijnsburger, M.C., Raadsen, S.A., Ligtenberg-Burgman, I., van der Zwaluw, K.W., Heck, M., Savelkoul, P.H., Kluytmans, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 2013.** High prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints. *Clin Microbiol Infect* 19, 542-549.
- Roberts, A.P., Chandler, M., Courvalin, P., Guédon, G., Mullany, P., Pembroke, T., Rood, J.I., Jeffery Smith, C., Summers, A.O., Tsuda, M., Berg, D.E., 2008.** Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167-173.
- Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J.C., Cisneros, J.M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J.P., Tórtola, T., Mirelis, B., Navarro, G., Cuenca, M., Esteve, M., Peña, C., C., L.A., Cantón, R., Pascual, A., 2008a.** Community infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med* 168, 1897-1902.
- Rodríguez-Baño, J., López-Cerero, L., Navarro, M.D., Díaz de Alba, P., Pascual, A., 2008b.** Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 62, 1142-1149.
- Rodríguez-Baño, J., Navarro, M.D., Romero, L., Martínez-Martínez, L., Muniain, M.A., Perea, E.J., Pérez-Cano, R., Pascual, A., 2004.** Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol* 42, 1089-1094.
- Rodríguez, M.M., Power, P., Sader, H., Galleni, M., Gutkind, G., 2010.** Novel chromosome-encoded CTX-M-78 beta-lactamase from a *Kluyvera georgiana* clinical isolate as a putative origin of CTX-M-25 subgroup. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 3070-3071.
- Sabaté, M., Navarro, F., Miró, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbé, J., Prats, G., 2002.** Novel complex *sull*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2656-2661.
- Sáenz, Y., 2004.** Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* no patógenas de alimentos y de la microflora de humanos y animales. In, Departamento de Agricultura y Alimentación, Área de Bioquímica y Biología molecular, Vol. Doctor. Universidad de La Rioja, City.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004.** Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3996-4001.

- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C.,** 2010. Class 1 integrons lacking *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol* 144, 493-497.
- Saladin, M., Cao, V.T., Lambert, T., Donay, J.L., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G.,** 2002. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from **Enterobacteriaceae** isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 209, 161-168.
- Seiffert, S.N., Hilty, M., Kronenberg, A., Droz, S., Perreten, V., Endimiani, A.,** 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in community, specialized outpatient clinic and hospital settings in Switzerland. *J Antimicrob Chemother.*
- Sköld, O.,** 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 32, 261-273.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C.,** 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 3, 119.
- Stapleton, P.D., Shannon, K.P., French, G.L.,** 1999. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1206-1210.
- Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J.E., Jr., Tenover, F.C.,** 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection methods. *J Clin Microbiol* 39, 2864-2872.
- Strömdahl, H., Tham, J., Melander, E., Walder, M., Edquist, P.J., Odenholt, I.,** 2011. Prevalence of faecal ESBL carriage in the community and in a hospital setting in a county of Southern Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30, 1159-1162.
- Suárez, C., Gudiol, F.,** 2009. Antibióticos Beta-lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27, 116-129.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., Deng, Y., Lei, T., Zhao, J., Liu, J.H.,** 2010. High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect* 16, 1475-1481.
- Sutton, M.D., Smith, B.T., Godoy, V.G., Walker, G.C.,** 2000. The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. *Annu Rev Genet* 34, 479-497.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.,** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28, 9.

**Tartof, S.Y., Solberg, O.D., Manges, A.R., Riley, L.W., 2005.** Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 43, 5860-5864.

**Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233-2239.

**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.

**Valverde, A., Cantón, R., Garcillan-Barcia, M.P., Novais, A., Galán, J.C., Alvarado, A., de la Cruz, F., Baquero, F., Coque, T.M., 2009.** Spread of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 5204-5212.

**Valverde, A., Coque, T.M., Sánchez-Moreno, M.P., Rollán, A., Baquero, F., Cantón, R., 2004.** Dramatic Increase in Prevalence of Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing **Enterobacteriaceae** during Nonoutbreak Situations in Spain. *J Clin Microbiol* 42, 4769-4775.

**van de Klundert, J.A., Vliegenthart, J.S., 1993.** Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 927-928.

**van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J., 2011.** Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2, 203.

**Venturi, V., Silva, D.P.d., 2012.** Incoming pathogens team up with harmless 'resident' bacteria. *Trends in Microbiology* 20, 160-164.

**Versporten, A., Coenen, S., Adriaenssens, N., Muller, A., Minalu, G., Faes, C., Vankerckhoven, V., Aerts, M., Hens, N., Molenberghs, G., Goossens, H., Group, E.P., 2011a.** European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient cephalosporin use in Europe (1997-2009). *J Antimicrob Chemother* 66 Suppl 6, vi25-35.

**Versporten, A., Coenen, S., Adriaenssens, N., Muller, A., Minalu, G., Faes, C., Vankerckhoven, V., Aerts, M., Hens, N., Molenberghs, G., Goossens, H., Group, E.P., 2011b.** European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient penicillin use in Europe (1997-2009). *J Antimicrob Chemother* 66 Suppl 6, vi13-23.

**Vinué, L., 2010.** Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*. In, *Agricultura y Alimentación, Área de Bioquímica y Biología molecular*, Vol. Doctor. Universidad de La Rioja, City, pp. 1-263.

**Vinué, L., Lantero, M., Sáenz, Y., Somalo, S., de Diego, I., Pérez, F., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2008a.** Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol* 57, 916-920.

**Vinué, L., Sáenz, Y., Martínez, S., Somalo, S., Moreno, M.A., Torres, C., Zarazaga, M.,** 2009. Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect* 15, 954-957.

**Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M.A., Ruiz-Larrea, F., Torres, C.,** 2008b. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J Antimicrob Chemother* 62, 934-937.

**Voets, G.M., Platteel, T.N., Fluit, A.C., Scharringa, J., Schapendonk, C.M., Stuart, J.C., Bonten, M.J.M., Hall, M.A.L., National, E.S.W.G.,** 2012. Population Distribution of Beta-Lactamase Conferring Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Human Clinical **Enterobacteriaceae** in The Netherlands. *PLoS One* 7, e52102.

**Walsh, F., Duffy, B.,** 2013. The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLoS One* 8, e65567.

**Wei, Q., Jiang, X., Yang, Z., Chen, N., Chen, X., Li, G., Lu, Y.,** 2009. *dfrA27*, a new integron-associated trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 63, 405-406.

**White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D.,** 2001. Integrons and gene cassettes in the **Enterobacteriaceae**. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2658-2661.

**Winkler, J., Kao, K.C.,** 2012. Harnessing recombination to speed adaptive evolution in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 14, 487-495.

**Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M.,** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60, 1136-1151.

#### **Páginas Web**

<https://www-is.biotoul.fr//>

<http://integrall.bio.ua.pt/>

<http://www.cmbn.no/tonjum/seqMassager-saf.htm>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<http://www.lahey.org/studies/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.expasy.org/tools/dna.html>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>

[http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo\\_html](http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli/GetTableInfo_html)

<http://www.pulsenetinternational.org/Pages/default.aspx>

<http://www.megasoftware.net/>

[http://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=J&showdescription=yes](http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=J&showdescription=yes)

