

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

3.1.1. Soques bacterianes

S'ha estudiat la presència de mutacions responsables de conferir resistència a quinolones en tota una col·lecció de soques d'*Escherichia coli* i de *Salmonella typhimurium* aïllades tant de mostres d'animals com d'origen hospitalari. Pel que fa a les soques d'*E. coli*, s'han analitzat 118 soques aïllades d'animal entre els anys 1994 i 2000 pel Laboratori de Sanitat Animal i 88 soques d'*E. coli* resistents a l'àcid nalidíxic d'origen humà, aïllades de mostres clíniques entre els anys 1993 i 2000 en el Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. A les taules 3.1 i 3.2 es presenten les soques d'*E. coli* estudiades. A més a més, i com a controls, s'han utilitzat les soques d'*E. coli* C-129 i EC-1, procedents del Laboratori de Sanitat Animal, i MC-1061, del Laboratori de Microbiologia Molecular (U.A.B.).

Pel que fa a les soques de *S. typhimurium*, s'han analitzat 61 soques resistents a l'àcid nalidíxic, presentant totes valors de CMI superiors a 342,64 µg/ml, aïllades entre els anys 1992 i 1998 pel Laboratori de Sanitat Animal. A la taula 3.3 es presenten les soques de *S. typhimurium* estudiades. S'han utilitzat, com a controls, dues soques sensibles a l'àcid nalidíxic, també procedents del Laboratori de Sanitat Animal: la S-5712, aïllada de porc l'any 1997, i la S-5978, aïllada de conill el mateix any. S'ha utilitzat també, com a control, la soca de *S. typhimurium* LT2, cedida per J. L. Ingraham, que presenta un nivell de susceptibilitat intermig a l'àcid nalidíxic.

Taula 3.1. Soques d'*E. coli* d'origen animal.

	1994	1996	1997	1998	1999	2000	TOTAL
Au	7	9	3	9	10	8	46
Boví	0	6	13	6	0	0	25
Conill	0	6	13	1	0	2	22
Porc	0	0	23	0	1	1	25
TOTAL	7	21	52	16	11	11	118

Taula 3.2. Soques d'*E. coli* Nal^R d'origen humà.

	1993	1994	1998	1999	2000	TOTAL
Orina	2	4	6	7	52	71
Sang	0	0	1	1	7	9
Catèter	0	0	0	0	2	2
Exudat	0	0	0	2	1	3
Esput	0	0	1	0	1	2
Bilis	0	0	0	1	0	1
TOTAL	2	4	8	11	63	88

Taula 3.3. Soques de *S. typhimurium* Nal^R d'origen animal.

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	TOTAL
Au	0	0	7	1	0	3	1	12
Boví	0	0	0	0	0	6	0	6
Conill	0	0	0	2	1	11	2	16
Oví	0	1	0	0	0	0	1	2
Porc	0	0	0	0	0	18	1	19
Tortuga	1	0	5	0	0	0	0	6
TOTAL	1	1	12	3	1	38	5	61

Finalment, per als treballs moleculars, s'ha emprat la soca d'*E. coli* DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80/*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* (Sambrook et. al., 1989)] de Clontech.

3.1.2. Plasmidis

Com a vector de clonació dels fragments amplificats per PCR s'ha utilitzat el plasmidi "pGEM[®]-T vector" de Promega. Aquest plasmidi té un tamany de 3 Kb, conté una regió MCS ("Multiple Cloning Site") en el gen *lacZ* i codifica resistència a ampicil.lina.

3.2. MÈTODES MICROBIOLÒGICS BÀSICS

3.2.1. Mètodes de cultiu i condicions de creixement

Els cultius de nit utilitzats en aquest treball s'han preparat segons els mètodes microbiològics convencionals. Els cultius líquids utilitzats per als experiments d'hibridació s'han fet en medi ric Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992), inoculant una colònia aïllada en placa en un tub de vidre de 18 ml de capacitat que contenia 5 ml de medi, mentre que els cultius de nit per extraccions de DNA cromosòmic i DNA plasmídic s'han fet en el medi altament ric Terrific Broth (TB) (Tartof i Hobbs, 1987), inoculant una colònia aïllada en placa en una ampolla de 100 ml de capacitat que contenia 10 ml de medi. També s'ha utilitzat el medi Nutrient Broth N^o 2 (d'acord amb les indicacions de la casa comercial Oxoid) per al creixement de les soques en plaques "microtitter" per a la seva posterior congelació amb dimetilsulfòxid (DMSO, Merck).

Les sembres en medi sòlid s'han realitzat en plaques de Petri que contenien medi LB amb un 17% d'agar. En el casos que era necessari, les

plaques s'han preparat suplementant el medi amb l'antibiòtic corresponent. La sembra de les colònies per a la seva posterior transferència a filtres s'ha fet en plaques de Petri que contenen medi NB amb un 16% d'agarosa.

La temperatura d'incubació tant per *E. coli* com per *S. typhimurium* ha sigut de 37°C. Els cultius líquids s'han incubat en agitació per aconseguir una bona aireació durant aproximadament 16 hores, fins arribar a una fase estacionària avançada.

3.2.2. Manteniment i conservació de les soques

Les soques d'*E. coli* s'han congelat amb DMSO de grau espectrofotomètric en plaques "microtiter" de tal manera que es tenen totes les soques perfectament ordenades i es coneix la localització exacta de cada soca. A partir dels cultius en placa s'ha sembrat cada soca en un pou d'una placa "microtiter" que contenia 100 µl de medi NB líquid. Les plaques s'han incubat tota la nit a 37°C i en agitació. Al dia següent, s'ha afegit a cada pou una barreja de medi líquid NB amb DMSO de tal manera que la concentració final de DMSO a cada pou és de 90 µl/ml. Aquestes plaques s'han congelat a -80°C.

A més, la majoria de les soques estudiades s'han mantingut sembrades per estria en plaques de LB suplementades amb la concentració adequada d'àcid nalidíxic. Les soques sensibles a aquest antimicrobià s'han mantingut en plaques de LB sense suplementar. Les plaques s'han segellat amb parafilm, per tal d'evitar la dessecació, i s'han conservat a 4°C entre 1 i 2 mesos. Passat aquest temps, s'ha tornat a fer una resembra.

Tot el conjunt de soques d'*E. coli* i *S. typhimurium*, tant d'origen animal com d'origen hospitalari, s'han congelat utilitzant el sistema Protect[®] (Technical Service Consultants LTD, Regne Unit) i es guarden d'aquesta manera en el Laboratori de Sanitat Animal. Els vials del sistema Protect

poden mantenir-se molt de temps en un congelador a -70°C sense que això signifiqui pèrdues de viabilitat i sense que s'introdueixin canvis en el comportament bioquímic de les soques.

3.2.3. Medis de cultiu

La composició dels medis utilitzats en aquest treball, així com la seva preparació es descriu a continuació:

Medi LB (Luria-Bertani Medium):

A 1000 ml d'aigua destil·lada s'hi afegeixen:

triptona (Pronadisa)	10 g
extracte de llevat (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g

Barrejar fins a la completa dissolució dels components i repartir en ampolles de 100 ml. Esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C .

Medi TB (Terrific Broth):

A 900 ml d'aigua destil·lada s'hi afegeixen:

triptona (Pronadisa)	12 g
extracte de llevat (Pronadisa)	24 g
glicerol (Panreac)	4 ml

Barrejar i esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C . Deixar refredar per sota de 60°C i afegir, en condicions d'esterilitat, 100 ml de la següent solució salina prèviament esterilitzada en l'autoclau:

KH_2PO_4	0,17 M
K_2HPO_4	0,72 M

Plaques Caso Agar (Casein-peptone Soymeal-peptone Agar) (Merck)

Caso Agar 40 g

Dissoldre en 1000 ml d'aigua destil·lada, esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C i repartir, en condicions d'esterilitat, en plaques de Petri de 90 mm de diàmetre (20 ml/placa).

Plaques MH (Agar Mueller-Hinton) (Merck)

Agar Mueller-Hinton 38 g

Dissoldre en 1000 ml d'aigua destil·lada, esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C i repartir, en condicions d'esterilitat, en plaques de Petri de 90 mm de diàmetre (20 ml/placa).

3.2.4. Solucions d'antibiòtics

Els antibiòtics s'han guardat en solucions 10 vegades concentrades (concentració de reserva o "stock") a -20°C i una vegada diluïts s'han mantingut a 4°C. Quan ha sigut necessari, s'han preparat les plaques de medi ja suplementades directament amb l'antibiòtic corresponent (un cop autoclavat el medi, es deixa refredar per sota de 60°C, s'hi afegeix estèrilment la quantitat adequada d'antibiòtic per assolir la concentració final desitjada i es reparteixen 20 ml de medi per placa de Petri de 90 mm de diàmetre, en condicions d'esterilitat). Els antibiòtics i la concentració final a la que s'han utilitzat són els següents: ampicil·lina (Boehringer-Mannheim), a 50 µg/ml, i àcid nalidíxic (Sigma), a 100 µg/ml. Els dos antibiòtics s'han dissolt en aigua ultrapura (Milli-Q).

3.2.5. Material i solucions

Àcid acètic 3%

àcid acètic 96% (Panreac) 62,50 ml
aigua destil·lada fins a volum final 2 litres.

Bromur d'etidi (10 mg/ml)

bromur d'etidi (Roche Diagnostics) 0,1 g
aigua ultrapura 10 ml

Dissoldre i guardar protegit de la llum.

Cloroform-isoamílic 24:1

Barrejar 480 ml de cloroform (Triclometà, Carlo Erba) amb 20 ml d'etanol isoamílic (Panreac). Mantenir a temperatura ambient.

EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA (Merck) 146,12 g
aigua destil·lada fins a 1 litre.

Equilibrar el pH a 8,0 afegint NaOH 10 N.

Fenol-cloroform 1:1

fenol (stock a 4°C) 250 ml
cloroform-isoamílic 24:1 250 ml

Afegir primer el fenol, aspirar el sobrenedant i afegir a continuació el cloroform-isoamílic. Deixar tota la nit a 37°C fins a que es separin les dues fases, aspirar la fase transparent fins a deixar 1 cm de fase i guardar a 4°C, protegit de la llum.

El fenol s'ha d'equilibrar prèviament a pH>7,8. Per això, el fenol (Sigma) en forma cristal·litzada emmagatzemat a -20°C s'ha de liquar escalfant-lo a 68°C. Se li afegeix 8-hidroxiquinoleïna (Panreac) fins a una concentració final de 0,1%. Una vegada el fenol s'ha fos i té el color groc característic degut a la 8-hidroxiquinoleïna, se li afegeix el mateix volum de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0), es barreja per agitació magnètica durant 15 minuts i es deixa reposar fins a que es separin les dues fases, la fase aquosa (fase superior, transparent) i la fase orgànica (fase inferior, groga). A continuació, s'elimina la fase aquosa superior per aspiració. Aquest pas s'ha de repetir tantes vegades com sigui necessari fins a que el fenol assoleixi un pH>7,8, però utilitzant per a la segona i properes vegades Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Una vegada el fenol està equilibrat i s'ha retirat la última fase aquosa, s'afegeixen 0,1 volums de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) que conté un 0,2% de β -mercaptoetanol. Aquesta solució es pot mantenir durant força temps si es conserva a 4°C i protegida de la llum.

ϕ x174-DNA \perp *Hinf*I (Promega)

ϕ x174-DNA \perp <i>Hinf</i> I (1 mg/ml)	50 μ l
Blue/Orange 6X Loading Dye	100 μ l
aigua ultrapura	350 μ l

Barrejar i repartir, en tubs eppendorf, alíquotes de 50 μ l. Aquestes es guarden congelades a -20°C. Quan s'ha de carregar (normalment entre 5 i 10 μ l), es descongela una alíquota, que es guardarà posteriorment a 4°C.

Glirerol 10%

glicerol (Panreac)	10 ml
aigua ultrapura	90 ml

Barrejar bé i esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C.

Isopropanol 80%

isopropanol (2-propanol) (Panreac)	80 ml
aigua ultrapura	20 ml

λ-DNA ⊥ *BstEII*

λ-DNA (0.25 µg/µl) (Roche Diagnostics)	180 µl
tampó de restricció B (Roche Diagnostics)	30 µl
enzim de restricció <i>BstEII</i> (10 U/µl) (Roche Diagnostics)	2 µl
aigua ultrapura	90 µl

Incubar a 60°C durant unes 2 hores i mitja, inactivar la reacció escalfant a 65°C durant 10 minuts i guardar a 4°C. Per a carregar: 2 µl en 8µl de solució transportadora diluïda.

λ-DNA ⊥ *HindIII*

λ-DNA (0.25 µg/µl) (Roche Diagnostics)	180 µl
tampó de restricció B (Roche Diagnostics)	30 µl
enzim de restricció <i>HindIII</i> (10 U/µl) (Roche Diagnostics)	2 µl
aigua ultrapura	90 µl

Incubar a 37°C durant unes 2 hores i mitja, inactivar la reacció escalfant a 65°C durant 10 minuts i guardar a 4°C. Per a carregar: 2 µl en 8µl de solució transportadora diluïda.

NaCl 5 M

Dissoldre 292 g de NaCl (Panreac) en un volum final de 1000 ml d'aigua destil·lada.

Nal 6 M

iodur sòdic (Panreac) 9 g
aigua ultrapura fins a 10 ml

Dissoldre i guardar a 4°C protegit de la llum.

NaOH 10 N

NaOH (Panreac) 40 g
aigua ultrapura fins a 100 ml.

Proteïnasa K (20 mg/ml)

proteïnasa K (Roche Diagnostics) 20 mg

Dissoldre en 1 ml d'aigua ultrapura i repartir, en tubs eppendorf, alíquotes de 50 µl.

RNasa A (10 mg/ml)

RNasa A (Roche Diagnostics)	0,010 g
Tric-HCl 1 M pH 7,5	10 µl
NaCl 5 M	3 µl
aigua ultrapura	987 µl

Dissoldre i escalfar a 100°C durant 15 minuts. Deixar refredar en gel i repartir, en tubs eppendorf, alíquotes de 20 µl. Aquestes alíquotes es guarden congelades a -20°C. Quan es necessita, es descongela una alíquota i es dilueix en 400 µl de tampó TE. Aquesta alíquota diluïda pot guardar-se a 4°C.

SDS 10%

Dodecil sulfat, sal sòdica (Merck) 100 g

Dissoldre en 900 ml d'aigua destil·lada i aplicant calor (fins a 68°C aproximadament). Ajustar a pH 7,2 amb unes gotes de HCl concentrat i enrasar fins a volum final 1 litre amb aigua destil·lada.

Solució d'acetat amònic 7M

CH₃COONH₄ (Panreac) 53,95 g

aigua destil·lada fins a volum final 100 ml

Dissoldre completament mitjançant agitació.

Solució de CTAB/NaCl

Dissoldre 4,1 g de NaCl (Panreac) en 80 ml d'aigua destil·lada i anar afegint lentament 10 g de CTAB (Sigma) amb agitació magnètica i escalfant. Si fos necessari, es pot augmentar la temperatura fins a 65°C per obtenir una bona dissolució. Conservar per sobre de 15°C per evitar la precipitació del CTAB.

Solució de DENHARDT

ficoll (Sigma) 5 g

PVP (Polivinilpirrolidona) (Sigma) 5 g

BSA liofilitzat (Sigma) 5 g

aigua ultrapura fins a volum final 500 ml

Agitar fins a dissolució, enrasar a 500 ml, filtrar i repartir en tubs de 10 ml.
Congelar a -20°C .

Solució de Desnaturalització (1,5 M NaCl, 2 M NaOH)

NaCl (Panreac)	43,83 g
NaOH (Panreac)	39,99 g
aigua destil·lada fins a volum final 500 ml	

Es pesen els components i es dissolen completament mitjançant agitació.

Solució de Neutralització (1 M Tris-Base, 2 M NaCl; pH 7,0)

TRIZMA-Base (Sigma)	60,56 g
NaCl (Panreac)	58,44 g
aigua destil·lada fins a volum final 500 ml	

Es pesen els components i es dissolen completament mitjançant agitació.
S'ajusta el pH a 7,0.

Solució d'Hibridació

Afegir 1 μl de sonda marcada per cada ml de solució de prehibridació.
Aquesta solució s'ha de desnaturalitzar a 65°C durant 5 minuts abans de fer-la servir. Guardar a -20°C .

Solució de Prehibridació

20XSSC	25 ml	(5XSSC)
EDTA (Merck)	0,372 g	(10 mM EDTA)
Sol. DENHARDT 50X	10 ml	(Sol. DENHARDT 5X)
Blocking Reagent (Boehringer-Mannheim)	2 g	(2% tampó de bloqueig)
Formamida (Boehringer-Mannheim)	25 ml	(25% formamida)
tampó fosfat sòdic 0,25 M pH 7,4	10 ml	(25 mM tampó fosfat sòdic pH 7,4)
aigua ultrapura	30 ml	

Barrejar mitjançant agitació magnètica i aplicant calor (no passar de 45-50°C) fins a una completa dissolució. Guardar a -20°C.

Solució I (Stock 2X)

Tris-HCl 1 M pH 8,0	50 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 ml
aigua ultrapura	910 ml

Per fer la solució I es barregen 50 ml de solució I (2X) amb 50 ml d'aigua ultrapura.

Solució II

NaOH 10 N	1 ml
SDS 10%	5 ml
aigua destil·lada	44 ml

Es prepara tot just abans del seu ús. Mantenir-la a temperatura ambient per evitar la precipitació del SDS (com a màxim 15 dies).

Solució III

acetat potàssic 5 M (Merk)	600 ml
àcid acètic glacial (Panreac)	11,5 ml
aigua destil·lada	285 ml

S'ajusta el pH a 4,8 amb HCl.

“STE buffer” (150 mM STE buffer pH 8,0)

Per a preparar 50 ml d'aquest tampó, dissoldre 0,438 g de NaCl (Panreac) en 40 ml de tampó TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, i 1 mM EDTA)

mitjançant agitació magnètica. Ajustar la solució a pH 8,0 utilitzant HCl diluït o NaOH segons convingui. Ajustar a 50 ml amb tampó TE, pH 8,0.

Tampó de càrrega (1X)

Diluir 200 µl del tampó concentrat en 1 ml d'aigua ultrapura.

Tampó de càrrega (6X)

xilè-cianol (Clontech)	0,25%
blau de bromofenol (Panreac)	0,25%
Glicerol (Panreac)	30%

Ajustar al volum final amb aigua ultrapura.

Tampó fosfat sòdic 0,25 M pH 7,4

Solució 1: dissoldre 1,0375 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) en 30 ml d'aigua destil·lada.

Solució 2: dissoldre 1,775 g de Na_2HPO_4 (Merck) en 50 ml d'aigua destil·lada.

Anar afegint, sobre la solució 2 en agitació magnètica, solució 1 fins arribar a pH 7,4.

Tampó TAE (1X)

tampó TAE 50X 40 ml
aigua destil·lada fins a 2 litres.

Tampó TAE (50X)

Tris Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
àcid acètic glacial (Panreac)	57,1 ml
aigua destil·lada fins a 1 litre.	

Tampó TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA)

Tris-HCl 1 M pH 7,5	1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	2 ml
aigua destil·lada fins a 100 ml	

Barrejar, ajustar el pH a 7,5 i esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C.

Tampó TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

Tris-HCl 1 M pH 8,0	1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,2 ml
aigua destil·lada fins a 100 ml	

Barrejar, ajustar el pH a 8,0 i esterilitzar en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C.

Tris-HCl 0,1 M pH 8,0

Tris-HCl (Sigma)	15,76 g
aigua ultrapura fins a 1 litre.	

Equilibrar el pH a 8,0 utilitzant hidròxid sòdic.

Tris-HCl 0,5 M pH 8,0

Tris-HCl (Sigma) 78,8 g

aigua ultrapura fins a 1 litre.

Equilibrar el pH a 8,0 utilitzant hidròxid sòdic.

Tris-HCl 1 M pH 7,5

Tris-HCl (Sigma) 157,6 g

aigua ultrapura fins a 1 litre.

Equilibrar el pH a 7,5 utilitzant hidròxid sòdic.

Tris-HCl 1 M pH 8,0

Tris-HCl (Sigma) 157,6 g

aigua ultrapura fins a 1 litre.

Equilibrar el pH a 8,0 utilitzant hidròxid sòdic.

SSC (3X)

Barrejar 60 ml de 20XSSC amb 340 ml d'aigua ultrapura.

SSC (20X)

NaCl (Panreac) 175,20 g

citrat sòdic tribàsic dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Merck) 88,23 g

aigua ultrapura fins a volum final 1 litre

Es pesen els components i es dissolen completament en 800 ml d'aigua ultrapura. S'ajusta el pH a 7,0 amb NaOH 10 N. S'ajusta el volum a 1000 ml i s'esterilitza en l'autoclau durant 15 minuts a 121°C.

3.3. DETERMINACIÓ DE LA SUSCEPTIBILITAT A ANTIMICROBIANS

Per a determinar la susceptibilitat de les soques d'*E. coli* i de *S. typhimurium* s'han realitzat **antibiogrames** emprant el mètode de **difusió amb discs impregnats d'antibiòtics** i seguint les indicacions del "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. 7th Ed. **M2A7**. January 2000). Aquesta part del treball s'ha dut a terme en el Laboratori de Sanitat Animal, en col·laboració amb Montserrat Saco.

Aquest procediment és un dels més generalitzats, ja que és un mètode fàcil, que es pot dur a terme com a rutina diària a qualsevol nivell i en qualsevol laboratori, i que ofereix resultats qualitius o semiquantitatius, clínicament útils si la tècnica està ben desenvolupada. Per a aquest mètode s'estableixen tres categories: S (Sensible), I (Intermig) i R (Resistent), i ha estat estandaritzat i posat a punt per avaluar la sensibilitat o resistència als antimicrobians dels microorganismes de creixement ràpid.

La **tècnica per difusió amb discs impregnats d'antibiòtics** va ser descrita inicialment per Ericsson (1954) i es fonamenta en el publicat per Kirby i Bauer en 1966. Es basa en utilitzar, com a suport per a l'aplicació dels antibiòtics, discs de paper o pastilles de material inert amb una quantitat determinada i estandaritzada d'antibiòtic, que es col·loquen en la superfície de plaques d'agar Mueller-Hinton, prèviament sembrades amb un cultiu recent del microorganisme en estudi. Aquestes plaques s'incuben a la temperatura adient per a cada microorganisme i durant el temps necessari per obtenir un bon creixement del mateix. L'antibiòtic del disc difon en l'agar i, a mesura que augmenta la distància respecte al disc, la concentració de l'antibiòtic disminueix logarítmicament, generant-se així un gradient de concentracions decreixents d'antibiòtic en el medi de cultiu situat al voltant de cada un dels discs d'antibiòtic estudiats. Al mateix temps, les bacteries sembrades en la placa van creixent. Si el microorganisme és sensible a l'antibiòtic estudiat no creix en una zona més o menys ampla al voltant del disc i apareix un hal·lus d'inhibició; si la soca és resistent no hi haurà hal·lus

d'inhibició al voltant del disc o apareixerà un hal·lus d'inhibició de diàmetre inferior al dels microorganismes sensibles.

En les tècniques dissenyades en un principi, s'interpretava directament la presència d'un hal·lus d'inhibició com a evidència de la sensibilitat dels microorganismes, però posteriorment es va comprovar que no sempre és així. Les tècniques utilitzades en l'actualitat es basen en les següents premisses:

- a) l'ús d'una metodologia assequible i rígidament estandaritzada en tots els seus punts com medi de cultiu, inòcul, càrrega dels discs, tècnica de sembra, incubació, lectura, etc.
- b) la mesura precisa de l'amplitud dels hal·lus d'inhibició i la seva interpretació d'acord amb la seva equivalència en valors de **Concentració Mínima Inhibitòria (CMI)**, per a cada antibiòtic en estudi. Els valors de CMI de cada antibiòtic s'interpolen, a partir de la mesura de l'amplitud dels hal·lus d'inhibició, en rectes de regressió. Aquestes rectes representen l'expressió gràfica de la correlació existent entre els valors obtinguts amb un nombre determinat de soques bacterianes del diàmetre dels hal·lus d'inhibició (mm) i els de CMI ($\mu\text{g/ml}$).

En aquest treball s'han utilitzat pastilles de Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca), que són unes tauletes rígides de 9 mm de diàmetre, extraordinàriament estables, fabricades en condicions estèrils amb substàncies inerts i a les que se'ls ha afegit l'antibiòtic corresponent, en forma cristal·lina i a concentració coneguda.

El **procediment** seguit per a la realització dels antibiogrames ha estat el següent:

1. Les soques d'*E. coli* i de *S. typhimurium* es cultiven en plaques de Caso Agar (Casein-peptone Soymeal-peptone Agar, Merck) a 37°C durant 18-24 hores.
2. Totes les manipulacions que es realitzin a partir d'aquest punt, s'hauran de fer dins d'una cabina de flux laminar i mantenint en tot moment les condicions d'asèpsia.
3. A partir dels creixements obtinguts en el primer pas, es preparen suspensions bacterianes utilitzant una solució estèril de NaCl al 0,45% (Vitek-BioMérieux) (SF) en tubs de plàstic estèrils de 11 mm x 70 mm (Soria Greiner, T-1111-E) i s'ajusten a la turbidesa de l'estàndard 0,5 de l'escala de Sulfat de Bari de McFarland; utilitzant un fotocolorímetre (VITEK Product No. 52-1210) amb filtre de 450 nm, amb el que una lectura de transmissió del 85% representa una suspensió bacteriana d'una turbidesa equivalent al 0,5 de l'escala de McFarland. Aquestes suspensions bacterianes contenen de l'ordre de $1,00 \times 10^8$ cfu/ml.
4. Abans de 15 minuts i utilitzant un hisop de cotó estèril empapat en la suspensió bacteriana, del que s'elimina l'excés de líquid pressionant contra les superfícies laterals del tub, es sembren les plaques d'agar Mueller-Hinton (MH, Merck), formulat segons la normativa NCCLS, prèviament atemperades a 37°C i amb la superfície seca. La sembra es fa per obtenir un cultiu confluent rera la incubació dels inòculs; això s'aconsegueix estenent la suspensió bacteriana empapada en el hisop per tota la superfície de la placa, en tres direccions diferents, girant cada vegada 1/3 l'orientació de la placa.
5. A continuació es dispensen les pastilles de Neo-Sensitabs, utilitzant els dispensadors subministrats pel fabricant (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca). Els antibiòtics i la seva concentració a la pastilla s'indiquen a la taula 3.4.
6. Les plaques d'agar Mueller-Hinton s'incuben, amb la capa d'agar cap amunt, en l'estufa de 37°C durant 18-24 hores.

7. Després d'aquest període d'incubació, es medeixen els hal·lus d'inhibició corresponents a cada antibiòtic, per la part inferior de les plaques i amb l'ajuda d'un peu de rei graduat.

8. En el quadre de treball corresponent s'anoten els hal·lus d'inhibició (en mm de diàmetre). Per a calcular la CMI ($\mu\text{g/ml}$), s'interpolen els valors del diàmetre dels hal·lus d'inhibició en la recta de regressió subministrada per la casa fabricant de les pastilles d'antibiòtics.

Taula 3.4. Pastilles d'antibiòtic utilitzades [Neo-Sensitabs (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca)] .

Antibiòtic	Concentració ($\mu\text{g/pastilla}$)
àcid nalidíxic	130
ciprofloxacina	10
enrofloxacina	10
norfloxacina	10
tetraciclina	80
cloranfenicol	60
ampicil·lina	33
amoxicil·lina	30
cefalexina	30

3.4. ESTUDI DE LES SOQUES BACTERIANES PER CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES

S'han realitzat diferents proves bioquímiques i s'ha estudiat la seva cinètica en totes les soques d'*E. coli* i *S. typhimurium*. Aquest estudi s'ha realitzat en el Laboratori de Sanitat Animal amb la col·laboració de M. Saco.

Per a això, s'ha emprat el sistema automàtic Vitek homologat per la FDA americana, que és capaç d'identificar bacteries fins a nivell d'espècie, i que compleix amb la normativa ISO 9000. La part central del sistema està formada per un incubador programat a una temperatura constant de 35°C. En aquest incubador s'hi col·loquen una sèrie de targes, amb 30 pouets cadascuna, i en ell s'analitza el grau d'extinció d'un feix de llum de 660 nm, a intervals de 60 minuts. Cadascun d'aquests pouets conté un medi de cultiu determinat per a una prova bioquímica donada. Les lectures del grau d'extinció en cada pouet són enviades a un equip informàtic que, després de processar-les i comparar-les amb la informació emmagatzemada en una base de dades, relaciona la soca analitzada amb alguna de les espècies bacterianes de la base de dades, quantificant el seu grau de fiabilitat. A més a més de l'utilitat d'aquest sistema per a identificar bacteris, també es pot fer servir per a estudiar la cinètica de creixement d'una soca ja identificada en diferents medis de cultiu. Aquesta darrera aplicació és la que s'ha emprat en aquest treball.

El sistema Vitek aporta dos tipus d'informació sobre els canvis temporals produïts en els pouets de cadascuna de les proves bioquímiques analitzades: les dades d'extinció del feix de llum, o *Raw Data*, i els percentatges horaris de canvi referenciats al valor inicial, o *PCTS Data* ("Percents of change", "Percent Change Values"). Per tal d'analitzar les cinètiques bioquímiques (CB) en diferents medis i comparar-les entre soques, s'empenen els valors dels *PCTS Data* doncs, al relativitzar les lectures horàries de cada pouet a un valor inicial que depèn de la concentració del inòcul, es minimitza l'efecte de la concentració inicial bacteriana i es

maximitza, per tant, la fiabilitat del mètode a l'hora de comparar les CB de diverses soques analitzades en diferents moments.

En aquest treball s'han utilitzat les targetes GNI de Vitek (BioMérieux, França), que contenen les proves bioquímiques indicades a la taula 3.5. Les targetes es van inocular amb una suspensió bacteriana ajustada a 1 en l'escala de Sulfat de Bari de McFarland. Per a preparar aquesta suspensió es va fer créixer cada soca en plaques de TSA (Tryptic Soy Agar, Merck) que es van incubar durant tota la nit a 37°C. Des d'aquestes plaques es va recollir el creixement i es van preparar les suspensions.

Després d'obtenir els resultats per a cada soca, les dades dels PCTS es van introduir en el programa "Microsoft Excel" per tal de processar-les, mitjançant un programa informàtic dissenyat pel doctor Ignasi Badiola (Centre de Recerca en Sanitat Animal). Aquest programa determina el grau de semblança relativa, expressat en tants per cent, entre diferents soques bacterianes, aplicant un algoritme basat en la denominada distància de Manhattan o en la distància Euclidiana. La primera és el resultat del sumatori dels valors absoluts de les diferències calculades per a una mateixa hora i prova bioquímica, entre dues bactèries a comparar. La segona és el resultat del sumatori del quadrat de les diferències calculades per a una mateixa hora i prova bioquímica, entre dues bactèries a comparar. El programa construeix una matriu de similituds relatives (SR) entre cadascuna de les bactèries analitzades i, a partir d'aquesta matriu, va separant les bactèries i construeix un dendograma que representa, de forma gràfica, el grau de relació existent entre les diferents bactèries. El programa també permet seleccionar l'interval de temps a comparar, així com les proves bioquímiques incloses en la comparació. A més, la selecció d'un punt de tall en el grau de SR fa que els grups de bactèries amb valors de SR superiors al del punt de tall triat es representin gràficament amb el mateix color, el que facilita la interpretació dels resultats.

Per a la construcció dels dendogrames s'han utilitzat les dades dels PCTS, de totes les proves bioquímiques entre l'hora 1 i l'hora 15, i l'algoritme de les distàncies de Manhattan.

Taula 3.5. Proves bioquímiques incloses en la tarja GNI de Vitek.

Pou	Nom de la prova	Activitat
1	DP3	Oxidació de la glucosa en presència del 0.03% de l'inhibidor 2,4,4'tricloro-2'-hydroxi-difenileter
2	OFG	Oxidació de la Glucosa
3	GC	Creixement en Peptona i Triptòfan
8	CIT	Utilització del Citrat, al 0.4%, com a font de carboni
9	MAL	Utilització del Malonat, al 0.8%, com a font de carboni
12	LAC	Oxidació de la Lactosa
13	MLT	Oxidació de la Maltosa
14	MAN	Oxidació del Manitol
15	XYL	Oxidació de la Xilosa
16	RAF	Fermentació de la Rafinosa
17	SO	Fermentació del Sorbitol
18	SUC	Fermentació de la Sacarosa
19	INO	Fermentació del Inositol
20	ADO	Fermentació de l'Adonitol
21	COU	Fermentació de la glucosa en presència del 0.03% de l'inhibidor p-Cumàric
22	H ₂ S	Producció de H ₂ S a partir del Tiosulfat sòdic
23	ONPG	Hidròlisi de l'ONPG, al 0.4%, per la Beta-galactosidasa i fermentació de l'orto-nitrofenol resultant
24	RHA	Fermentació de la Ramnosa
25	ARA	Fermentació de la L-Arabinosa
26	GLU	Fermentació de la Glucosa
27	ARG	Hidròlisi de l'Arginina
28	LYS	Descarboxilació de la Lisina
30	ORN	Descarboxilació de l'Ornitina

3.5. MÈTODES GENÈTICS

3.5.1. Electrotransformació

La tècnica de l'electrotransformació, o electroporació, s'utilitza per introduir DNA forani dins cèl·lules competents d'una soca que s'ha escollit com a receptora. Aquest mètode es basa en l'aplicació d'un pols elèctric d'elevat voltatge que despolaritza la membrana bacteriana creant, de forma transitòria, porus a través dels quals es produeix l'entrada del DNA (Shigekawa i Dower, 1988). Totes les electrotransformacions s'han realitzat amb un equip Gene Pulser i Gene Controller (Bio-Rad) i seguint la metodologia basada en els protocols modificats del fabricant que es detallen a continuació. Hi ha, però, alguns factors limitants en relació a l'eficiència del procés. Per exemple, és important que les cèl·lules estiguin en un bon estat fisiològic i el més lliures de sals possibles, per això s'utilitza medi LB amb la meitat de NaCl per al creixement de les cèl·lules. També és molt important la qualitat del DNA. Aquest ha d'estar dissolt en una solució de baixa força iònica com pot ser el tampó TE (pH 7,5), (Appendix B. Sambrook et. al., 1989).

Procediment:

A. Preparació de les cèl·lules

Les cèl·lules competents s'han preparat segons el següent protocol:

1. A partir d'una colònia aïllada, preparar un cultiu de nit en 10 ml de medi LB modificat (0,5% NaCl).
2. Fer una resembra 1:100 (els 10 ml en 1000 ml) en medi LB fresc (0,5% NaCl) contingut en un erlenmeyer de dos litres.
3. Incubar a 37°C amb agitació moderada fins aconseguir una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,6.

4. Refredar el cultiu en gel durant 15 minuts. A partir d'aquest moment s'haurà de tenir tot el material i les solucions que hagin d'estar en contacte amb les cèl·lules a 4°C.
5. Centrifugar el cultiu en tubs de propilè de 250 ml (prerefredats) a 6000 rpm durant 10 minuts i a 4°C.
6. Eliminar ràpidament el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1000 ml d'aigua ultrapura (Milli-Q) estèril i freda. Centrifugar a 6000 rpm durant 10 minuts i a 4°C. Amb aquest procés s'aniran eliminant les sals provinents del medi de cultiu.
7. Repetir l'últim pas.
8. Decantar amb compte el sobrenedant i resuspendre el sediment en 20 ml d'una solució estèril i freda de glicerol al 10% (preparada amb aigua ultrapura). Passar la suspensió a un tub de propilè de 30 ml.
9. Centrifugar a 4000 rpm durant 15 minuts i a 4°C. Decantar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 1 ml de glicerol al 10% fred. En aquest punt la suspensió cel·lular ha d'estar una concentració de $1-2 \times 10^{10}$ cfu/ml.
10. Repartir alíquotes de 50 μ l de la suspensió cel·lular en tubs eppendorf prèviament refredats. Congelar ràpidament en neu carbònica.
11. Guardar els tubs a -80°C .

B. Procés d'electrotransformació

1. Descongelar les cèl·lules competents en gel (per a que el procés de descongelació no sigui tant brusca i evitar danyar les cèl·lules).
2. Afegir 2 μ l de solució de DNA (producte de la lligació) i deixar en gel uns 5 minuts.
3. Ajustar el Gene Pulser Apparatus a 25 μ F de capacítància i 200 Ω de resistència en paral·lel.
4. Transferir la barreja de cèl·lules i DNA al fons d'una cubeta d'electrotransformació freda.
5. Col·locar la cubeta en la cambra del Gene Pulser i comprovar que estigui en contacte amb els pols de l'interior de la cambra.

6. Aplicar un pols elèctric, normalment entre 2,0-2,5 kV quan s'utilitzin cubetes de 0,2 cm de diàmetre intern. Per fer això, pressionar els botons que generen el pols elèctric fins escoltar un senyal acústic que indica la finalització del pols. S'aconsegueix una intensitat de camp elèctric de 10-12,5 kV/cm ($E=V/d$, on V és el voltatge aplicat i d és el diàmetre intern de la cubeta en cm). En les condicions indicades el temps constant del pols aplicat ha sigut aproximadament d'entre 4 i 5 ms de durada.

7. Treure la cubeta i afegir ràpidament 1 ml de medi BHI fred amb una micropipeta. En aquest pas és molt important la rapidesa, ja que l'eficiència de transformació disminueix un 60% si es triga més de 1 minut en el procés d'incubació post-pols elèctric i fins a un 90% si es triga més de 30 minuts. Barrejar bé amb la micropipeta i transferir la suspensió cel·lular electrotransformada a un tub de vidre estèril i incubar a 37°C en agitació entre 45 i 60 minuts, per tal de permetre l'expressió fenotípica.

8. Passat el temps d'incubació, sembrar les dilucions adequades en el medi selectiu corresponent. En aquest treball, els electrotransformants d'*E.coli* DH5 α s'han seleccionat sembrant 100 μ l, 200 μ l i 300 μ l de la suspensió cel·lular electrotransformada en plaques LB suplementades amb ampicil·lina i 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactopyranoside [X-GAL (Apollo Scientific)] a 40 μ g/ml emprant N,N-dimetilformamida com a solvent.

3.6. TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE DNA

La majoria de les tècniques que s'han utilitzat són les descrites en Sambrook *et al.* (1989) i Ausubel *et al.* (1989), encara que en alguns casos s'han introduït petites modificacions.

3.6.1. Miniextraccions de DNA cromosòmic

El procediment que s'ha utilitzat per fer les extraccions de DNA cromosòmic està basat en la llisi cel·lular mediada per detergents (SDS 10%)

i proteïnasa K, seguida d'una incubació amb bromur d'hexadeciltrimetil amoni (CTAB), que segresta polisacàrids i proteïnes residuals. A continuació es fan rentats, per tal d'eliminar les proteïnes, amb fenol-cloroform 1:1 i, finalment, amb cloroform-isoamílic 24:1, per eliminar les restes de fenol.

El protocol descrit a continuació correspon a una extracció de DNA des de petits volums de cultiu amb un grau de puresa relativament acceptable. Quan es requereixen quantitats més grans de DNA cromosòmic amb un elevat grau de puresa, s'adaptin les quantitats detallades a continuació a un volum de cultiu més gran i l'extracció es purifica posteriorment per ultracentrifugació en CsCl.

Procediment:

Es parteix d'un cultiu de nit, que s'ha preparat inoculant una colònia aïllada en placa en una ampolla de 100 ml de capacitat que contenia 10 ml de medi TB i s'ha incubat a 37°C i en agitació, durant unes 16 hores.

1. Centrifugar 1,5 ml del cultiu bacterià ben crescut en un tub eppendorf durant 2 minuts.
2. Eliminar el sobrenedant per aspiració.
3. Resuspendre el sediment amb 567 µl d'aigua ultrapura i afegir 30 µl de SDS 10% i 3 µl de proteïnasa K (20 mg/ml). Barrejar per inversió fins a que el cultiu s'hagi aclarit i tornat viscos degut a la llisi alcalina.
4. Incubar a 37°C durant 1 hora.
5. Afegir 100 µl de NaCl 5 M i tornar a barrejar. Aquest és un pas important ja que el CTAB forma complexos i precipita amb els àcids nucleics en concentracions de sal inferiors a 0,5 M.
6. Afegir 80 µl de solució CTAB/NaCl preescalfada a 65°C. Tornar a barrejar i incubar a 65°C durant 10 minuts, barrejant periòdicament. Durant aquest procés s'ha d'anar aclarint l'emulsió.

7. Afegir el mateix volum (uns 750 μ l) de cloroform-isoamílic (24:1 v/v), barrejar fins a aconseguir una bona emulsió i centrifugar durant 5 minuts.
8. Transferir el sobrenedant a un altre tub, tenint en compte no extreure part de la interfase, utilitzant puntes de micropipeta prèviament retallades per evitar al màxim el trencament mecànic del DNA. El sobrenedant ha de tenir una consistència viscosa, senyal de la presència d'una bona quantitat de DNA genòmic d'elevat pes molecular. Afegir un volum de fenol-cloroform (1:1 v/v) i barrejar bé per inversió.
9. Centrifugar durant 5 minuts i recuperar la fase aquosa. Repetir els dos últims passos fins obtenir una fase superior més o menys transparent.
10. Fer un últim pas amb cloroform-isoamílic, centrifugant 3 minuts, per eliminar les restes de fenol.
11. Afegir 0,6 volums d'isopropanol (Panreac) i barrejar per inversió. S'ha d'observar l'aparició de filaments blanquinosos (precipitació del DNA cromosòmic). Centrifugar durant 10 minuts.
12. Eliminar l'isopropanol per decantació i rentar el sediment amb 1 ml d'etanol al 70% (30 ml d'etanol absolut, Carlo Erba, en 70 ml d'aigua ultrapura) fred centrifugant durant 5-10 minuts.
13. Eliminar l'etanol per aspiració i assecar al buit en el Speed Vac.
14. Suspènre el DNA en 100 μ l de tampó TE + RNasa A i incubar durant 1 hora a 37°C. Degut al seu elevat pes molecular, el DNA pot trigar en suspènre's; en aquest cas pot deixar-se a 60°C fins a la seva total suspensió o tota la nit a 37°C.

3.6.2. Miniextraccions de DNA plasmídic

El procés d'aïllament de DNA plasmídic es basa en el diferent comportament del DNA plasmídic respecte al DNA cromosòmic en condicions desnaturalitzants com són la temperatura elevada o el pH bàsic. D'aquesta manera, el DNA plasmídic conservarà la seva estructura circular tancada covalentment, mentre que el DNA cromosòmic es trencarà pels

punts d'hidrogen. Aquests dos comportaments són deguts a les diferències de grandària i de topologia dels dos tipus de DNA.

La miniextracció de DNA plasmídic és una tècnica d'ús habitual amb diferents finalitats, obtenint-se una certa quantitat de DNA de relativa puresa, suficientment adequada per dur a terme comprovacions del plasmidi per restricció o bé per a la seva utilització per la transformació. El procediment que es detalla a continuació està basat en la llisi alcalina i l'eliminació de proteïnes amb fenol-cloroform, modificat de Birnboim i Doly (1979). En el cas que es requereixi gran quantitat de DNA plasmídic, s'adapten les quantitats detallades a continuació a un volum de cultiu més gran i el DNA extret es sotmet posteriorment a un gradient de CsCl.

Procediment:

Es parteix d'un cultiu de nit, que s'ha preparat inoculant una colònia aïllada en placa en una ampolla de 100 ml de capacitat que contenia 10 ml de medi TB, amb els antibiòtics corresponents, i s'ha incubat a 37°C i en agitació, durant unes 16 hores.

1. Transferir 1,5 ml del cultiu de nit a un tub eppendorf i centrifugar 30 segons a temperatura ambient.
2. Eliminar el sobrenedant per aspiració. Centrifugar 10 segons més i eliminar la resta de medi.
3. Resuspendre en 100 µl de **solució I** freda.
4. Afegir 200 µl de **solució II** i barrejar per inversió fins a obtenir una solució viscosa però transparent. Deixar 5 minuts en gel. Convé no excedir aquest temps, doncs sinó s'augmentarà la quantitat de DNA plasmídic de cadena senzilla, que té menor mobilitat electroforètica que el cccDNA.
5. Afegir 150 µl de **solució III** freda i barrejar bé per inversió o suaument amb el vòrtex (agitador de tubs). Deixar 10 minuts en gel. Durant aquest

temps la majoria de les proteïnes i el DNA cromosòmic precipiten, observant-se l'aparició de flòculs blancs que corresponen a les restes cel·lulars.

6. Centrifugar 10 minuts a temperatura ambient.

7. Transferir el sobrenedant a un nou tub eppendorf, vigilant de no arrossegar cap resta de sediment perquè aquesta contaminació podria inhibir posteriorment l'activitat d'algun enzim de restricció.

8. Afegir un volum igual de fenol-cloroform (1:1 v/v) i barrejar enèrgicament fins obtenir una emulsió homogènia.

9. Centrifugar durant 5 minuts.

10. Transferir la fase aquosa (superior) a un altre tub eppendorf i repetir els passos 8 i 9.

11. Transferir la fase aquosa a un tub net i afegir un volum igual de cloroform-isoamílic (24:1 v/v). Així s'eliminen les restes de fenol-cloroform, les quals podrien inhibir algunes reaccions. Agitar enèrgicament.

11. Centrifugar durant 5 minuts.

12. Recuperar la fase aquosa (superior) en un tub eppendorf nou i afegir 2 volums d'etanol absolut (Carlo Erba) fred (900 μ l), barrejar i deixar a -80°C durant 30 minuts. Centrifugar durant 10 minuts.

13. Eliminar el sobrenedant per aspiració i rentar el sediment (blanquinós) amb 1 ml d'etanol al 70% (30 ml d'etanol absolut, Carlo Erba, en 70 ml d'aigua ultrapura) fred centrifugant durant 10 minuts.

14. Eliminar l'etanol per aspiració i assecar al buit en el Speed Vac.

15. Resuspendre en 20 μ l de tampó TE + RNasa A. Deixar uns 30-45 minuts a 37°C per facilitar la resuspensió del DNA i l'eliminació del contingut en RNA. El DNA obtingut ja és de la suficient puresa com per treballar amb els enzims de restricció. Si no fos així, repetir el procediment a partir del punt 8.

16. Analitzar la quantitat i qualitat del DNA carregant 1 μ l en un gel d'agarosa.

Per a un ús freqüent es pot guardar el DNA extret a 4°C , en cas contrari és millor conservar-lo congelat a -20°C .

3.6.3. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Quan en la cèl·lula bacteriana entra DNA exogen estrany, aquesta el degrada mitjançant les anomenades endonucleases de restricció. Aquests enzims presenten una marcada especificitat respecte a seqüències de DNA, ja que reconeixen seqüències palindròmiques de 4 a 6 parells de bases i actuen sobre elles trencant els enllaços fosfodièster; tallant, per tant, les dues cadenes de DNA en la seqüència de reconeixement o prop d'ella. Les condicions òptimes de digestió per als diferents enzims no són molt estrictes, però cada enzim de restricció presenta requeriments de força iònica i condicions específiques de reacció, sobretot pel que fa a la temperatura, així que en cada cas s'ha d'utilitzar el tampó de restricció corresponent i s'ha d'incubar la reacció a la temperatura recomanada per la casa comercial. Per a digestions dobles, cal tenir en compte la compatibilitat dels enzims amb el tampó. En totes les restriccions fetes en aquest treball s'han utilitzat enzims i tampons de Roche Diagnostics. S'han fet restriccions per comprovar molècules de DNA recombinants. En cada restricció s'ha afegit una unitat de cada enzim (*Apal* i *SacI*, 10 U/ μ l) per μ g de DNA, normalment entre 1 i 3 μ g, 2 μ l del tampó de restricció corresponent, el volum final de la reacció ha sigut de 20 μ l i s'ha incubat a 37°C durant tota la nit. Les digestions s'han comprovat en gels d'agarosa.

3.6.4. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Aquesta és una tècnica bàsicament analítica, ja que s'utilitza per a separar i identificar fragments de DNA, però també es pot realitzar una electroforesi preparativa, que permet l'aïllament d'un determinat fragment a partir d'una mescla heterogènia. Es basa en la migració unidireccional del DNA a través d'una matriu porosa quan se li aplica un camp elèctric. A pH neutre el DNA té càrrega negativa, la qual cosa comporta la seva migració des del pol negatiu (càtode) cap al pol positiu (ànode). La mobilitat electroforètica dels diferents fragments depèn, sobretot, de la seva grandària

i es veu poc afectada per la composició de bases o per la seqüència. Els factors determinants de la mobilitat són els següents (Sambrook et. al., 1989):

Longitud del DNA. Les molècules de DNA lineal migren a través del gel a una velocitat que és inversament proporcional al logaritme del seu pes molecular. D'aquesta manera, pot determinar-se la longitud d'un fragment de DNA desconegut, o comprovar que un fragment determinat té la longitud esperada, per electroforesi juntament amb marcadors de pes molecular conegut, generalment DNA del fag λ digerit amb els enzims *HindIII* o *BstEII*, i que donen lloc als següents pesos moleculars (en Kb):

$\lambda \perp$ *HindIII*: 23,13; 9,41; 6,55; 4,36; 2,32; 2,02; 0,56; 0,12.

$\lambda \perp$ *BstEII*: 14,14; 8,45; 7,24; 6,36; 5,68; 4,82; 4,32; 2,67;
2,32; 1,92; 1,37; 1,26; 0,70; 0,22; 0,12.

Per a comprovar la longitud de fragments de mida petita s'utilitza també, com a marcador de pes molecular, DNA del fag ϕ x174 digerit amb l'enzim *Hinfl* que dóna lloc als següents pesos moleculars (en pb):

ϕ x174 \perp *Hinfl*: 726; 713; 553; 500; 427-417-413; 311; 249; 200;
151; 140; 118; 100; 82, 66; 48-42-40; 24.

Conformació estructural del DNA. Una mateixa seqüència de DNA plasmídic pot presentar-se en tres formes diferents (DNA circular tancat, DNA circular relaxat i DNA lineal), podent-se desplaçar cadascuna d'elles a diferent velocitat en un gel. Les mobilitats relatives depenen essencialment de la porositat del gel, encara que també estan influïdes pel corrent aplicat, la força iònica del tampó de recorregut, així com per la densitat de girs superhelicoidals de la molècula circular tancada. En els gels més comunament emprats, amb agarosa al 0,7% i amb bromur d'etidi com a

agent intercalant, l'ordre, a partir de la banda de migració més ràpida, seria: DNA circular tancat, DNA lineal i DNA circular relaxat.

Porositat del gel. Existeix una relació directa entre el logaritme de la mobilitat electroforètica d'un fragment de DNA i la porositat del gel, que ve donada per la concentració d'agarosa. Els gels d'agarosa poden utilitzar-se per separar fragments de DNA des de 70 pb (agarosa 3%) fins 800 Kb (agarosa 0,1%).

Corrent elèctric aplicat. La velocitat de migració dels fragments de DNA lineal és proporcional al voltatge aplicat. Per obtenir la màxima resolució dels fragments de DNA no s'han d'aplicar més de 5 V/cm.

La quantitat mínima de DNA detectat en un gel d'agarosa es de 10 ng, essent 100 ng la quantitat òptima. La visualització dels fragments de DNA s'aconsegueix mitjançant la incorporació al gel d'un colorant fluorescent, normalment bromur d'etidi, que s'intercala entre les dues cadenes de DNA. Aquest colorant revela la presència d'una banda de DNA al ser il·luminada amb llum ultravioleta de longitud d'ona curta (310 nm).

Preparació d'un gel d'agarosa:

Per tal d'estimar la concentració de DNA cromosòmic o plasmídic s'han preparat gels amb una concentració d'agarosa del 0,4% i 0,7%, respectivament. També s'han preparat gels per visualitzar patrons de restricció i per a recuperar fragments de DNA amplificats per PCR. En aquests dos últims casos, la concentració d'agarosa depenia del tamany dels fragments de DNA que s'esperaven, essent una concentració d'agarosa del 3% la més utilitzada, ja que s'ha treballat amb fragments petits, entre 100 i 400 pb aproximadament. En aquests casos, s'ha utilitzat com a marcador de pes molecular el DNA del fag ϕ x174 \perp *Hinfl*.

Els gels d'agarosa s'han preparat segons es descriu a continuació:

1. Pesar la quantitat corresponent d'agarosa en pols (Grau Biologia Molecular, Roche Diagnostics) i afegir el volum corresponent de tampó d'electroforesi (TAE 1X).
2. En un microones, escalfar fins que se fongui l'agarosa, evitant que quedin partícules en suspensió.
3. Deixar refredar fins a uns 50-55°C, afegir bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/ml a partir d'una solució stock de 10 mg/ml (conservada en la foscor).
4. Abocar la solució sobre el suport del gel, al que se l'han segellat els extrems amb cinta adhesiva. Col·locar una pinta a 0,5-1 cm de l'extrem, verificant que està separada de la base del suport de 0,5 a 1 mm per a que els pouets estiguin íntegres. Deixar a temperatura ambient de 30 minuts a 1 hora, fins que estigui solidificat.
5. Treure la pinta tenint cura de no fer malbé els pouets. Col·locar el gel en la cubeta d'electroforesi plena de tampó (TAE 1X), el qual també ha de cobrir el gel.

Per a carregar les mostres de DNA, aquestes s'han barrejat amb tampó de càrrega (6X), en una proporció 1/10 del volum final a carregar. Per tal d'estimar la concentració de DNA cromosòmic o DNA plasmídic tan sols s'ha carregat 1 µl de mostra barrejat amb 9 µl de tampó de càrrega diluït (1X). L'electroforesi s'ha fet en tampó TAE 1X utilitzant cubetes d'electroforesi (BioRad) i aplicant un voltatge de 75 volts. La migració del DNA s'ha controlat il·luminant el gel amb un transil·luminador de radiació ultravioleta (UVP). D'alguns gels s'han realitzat fotografies utilitzant una càmera Mitsubishi Video Copy Processor.

Amb la finalitat de recuperar, posteriorment, els fragments d'entre 100 i 400 pb, el producte de l'amplificació s'ha carregat en un gel al 3% preparat amb agarosa de grau LOW [25% d'agarosa grau Biologia Molecular (Roche Diagnostics) i 75% d'agarosa LM-Sieve (Pronadisa)], ja que així es facilita la dissolució de la regió d'agarosa que conté el fragment que es vol recuperar.

3.6.5. Recuperació de fragments de DNA

A l'hora de purificar fragments de DNA a partir de gels d'agarosa hi ha dos inconvenients fonamentals. En primer lloc, les diferents agaroses existents solen estar contaminades per polisacàrids sulfatats que poden extreure's juntament amb el DNA. Aquests compostos són potents inhibidors dels enzims emprats en les tècniques de Biologia Molecular. En segon lloc, el rendiment de la recuperació de fragments de DNA de gran grandària sol ésser baix. Aquests segon problema, però, no ha afectat a aquest treball, ja que tan sols s'han hagut de recuperar fragments d'entre 100 i 400 pb aproximadament.

Quan s'ha de recuperar un fragment obtingut per restricció, és molt important haver aconseguit una bona separació entre el que interessa i els altres possibles fragments, per tal d'evitar contaminacions. En aquest treball, només s'han recuperat fragments procedents d'una amplificació per PCR, per tant això tampoc ha suposat cap problema ja que en el gel només ha corregut un sol fragment.

Procediment:

1. Carregar el volum total d'una reacció d'amplificació (100 μ l) en un gel d'agarosa al 3% LOW i realitzar una electroforesi en tampó TAE 1X utilitzant cubetes d'electroforesi (BioRad) i aplicant un voltatge de 75 volts.
2. Tallar la regió d'agarosa que conté el fragment de DNA desitjat i pesar-la dins d'un tub eppendorf prèviament tarat. El pes obtingut no hauria de ser superior a 0,4 g (en aquest cas s'hauria de tallar i posar-la en un altre tub eppendorf).
3. Afegir de 2 a 3 volums (respecte el pes de la regió d'agarosa tallada) de solució de iodur sòdic 6 M.
4. Incubar en un bany a 45-55°C durant 5 minuts. Comprovar que l'agarosa s'hagi dissolt en la seva totalitat. Si no és així, continuar amb el tractament.

5. Repartir la solució obtinguda en alíquotes de 500 μl i afegir 800 μl de *Wizard[®] PCRpreps DNA Purification Resin* de Promega. Aquesta resina segresta només el DNA. Barrejar per inversió i esperar uns 5 minuts.
6. Abocar el contingut del tub eppendorf dins d'una xeringa prèviament montada sobre una columna de purificació de DNA. Introduir l'èmbol i prémer amb continuïtat.
7. Treure la xeringa de la columna. En aquest moment, el complex DNA-resina està retingut al filtre que hi ha a la columna. Treure l'èmbol i tornar a connectar la xeringa a la columna. Afegir 2 ml d'isopropanol al 80% i prémer amb l'èmbol. D'aquesta manera es renta el DNA.
8. Centrifugar la columna, prèviament col·locada sobre un tub eppendorf, durant 2 minuts per tal d'eliminar les restes d'isopropanol.
9. Afegir 20 μl de tampó TE a l'interior de la columna i esperar uns 5 minuts (també es pot recuperar el DNA afegint 20 μl d'aigua ultrapura una mica calenta, que farà més fàcil la dissolució del DNA). Eluir el DNA per centrifugació (2-5 minuts). Transferir el DNA obtingut a un nou tub eppendorf.
10. Visualitzar el DNA recuperat carregant 1 μl en un gel d'agarosa.

3.6.6. Lligacions de fragments de DNA a vectors plasmídics

La lligació permet unir un fragment de DNA a un vector plasmídic linearitzat, aprofitant les característiques de l'enzim DNA lligasa, i obtenir un plasmidi recircularitzat que conté el fragment que interressi. Aquest plasmidi recombinant pot introduir-se, per exemple per electrotransformació, dins cèl·lules competents per, posteriorment, obtenir-ne gran quantitat per a diferents finalitats.

En aquest treball s'han fet lligacions per a clonar, en el vector pGEM[®]-T, diferents fragments de DNA obtinguts per PCR, i recuperats d'un gel d'agarosa, per posteriorment seqüenciar-los. Aquest vector es subministra comercialment ja linearitzat, per tant es pot emprar directament en reaccions

de lligació. A més, en els seus extrems té cues de timines que són complementàries de les cues d'adenines que presenten els productes amplificats per PCR. També conté dianes úniques de tall d'un gran nombre d'enzims de restricció a ambós costats del lloc de clonació, la qual cosa permet obtenir el fragment de manera fàcil. Les lligacions s'han dut a terme utilitzant el kit "pGEM[®]-T Vector System I" de Promega i seguint el protocol descrit per la casa comercial.

El volum final de la reacció de lligació ha sigut de 5 µl, s'ha incubat a 25°C durant tota la nit i, abans d'electrotransformar el producte de la lligació en cèl·lules competents d'*E. coli* DH5α, s'ha inactivat incubant a 70°C durant 10 minuts. Les quantitats de cada un dels reactius d'una reacció de lligació es detallen a continuació.

Barreja de lligació:

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (tampó de lligació)	2,5 µl
DNA del vector pGEM [®] -T (54 ng/µl)	0,5 µl
fragment de PCR a lligar	uns 100 ng
DNA lligasa del fag T4 (3 U/µl)	0,5 µl
aigua ultrapura fins a volum final 5 µl.	

3.6.7. Amplificació de fragments de DNA per PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'utilitza per amplificar de forma exponencial *in vitro* un fragment específic de DNA que està localitzat entre dues regions de seqüència coneguda. La PCR requereix tres components bàsics: el DNA motlle de doble cadena a partir del qual se'n vol amplificar un segment, els "primers" o cebadors que flanquegen la regió a

amplificar i la DNA polimerasa. Addicionalment calen dNTPs per produir nou DNA en un tampó de reacció adequat.

La reacció consisteix en una sèrie de reaccions en cadena, o el que és el mateix, la repetició d'un cicle de tres fases: una fase de desnaturalització del motlle; una segona d'anellament dels "primers", presents en excés, amb les seqüències dianes i una tercera fase d'extensió o síntesi de DNA a partir dels "primers". Degut a que els productes d'un cicle complet serveixen com a motlles pel següent, cada cicle successiu duplica la quantitat del fragment de DNA, obtenint-se al final del procés un nombre de molècules de DNA de $N \cdot 2^X$, on N és el nombre de molècules inicial i X és el nombre de cicles realitzats. Una amplificació de 30 cicles proporciona, a partir de tan sols una còpia del DNA motlle, més d'un milió de còpies del fragment d'interès.

Hi ha una sèrie de paràmetres crítics que s'han de tenir en compte a l'hora d'optimitzar la PCR per a una aplicació en concret:

"Primers": s'han d'escollir complementaris a la regió que es desitja amplificar. Cada "primer" ha d'hibridar amb una cadena diferent i amb els extrems 3' orientats de tal manera que quan la polimerasa actuï en direcció 5'→3' estengui la regió de DNA situada entre ells. Han de tenir una longitud d'uns 20 nucleòtids, no han de ser complementaris entre si per evitar la formació de dímers i no han de tenir estructures secundàries.

DNA motlle: ha d'estar lliure de compostos inhibidors de la PCR, com són detergents o alcohols. La quantitat de motlle ha de ser suficient per a poder detectar el producte en 25-30 cicles però no excessiva, per evitar una disminució en l'eficiència de la reacció.

dNTPs: no han d'estar en excés perquè poden quelar el magnesi, que és un dels ions clau en la reacció.

Tampó de reacció: ha d'estar ajustat a la concentració de clorur de magnesi necessària en cada cas, ja que aquest paràmetre és diferent per a cada combinació de “primers” i motlle emprada. En totes les reaccions d'amplificació realitzades en aquest treball s'ha utilitzat el tampó de reacció facilitat per la casa comercial. S'ha de procurar evitar, amb una manipulació acurada, la contaminació de qualsevol component de la reacció amb DNA estrany que podés interferir.

Durada i temperatura dels cicles: ha de permetre, en cada fase de les esmentades anteriorment, una desnaturalització completa, un anellament estable dels “primers”, el qual depèn de la seva composició en GC, i també una extensió completa. El temps de “rampa”, és a dir, el necessari perquè la mostra arribi a la temperatura desitjada ha de ser el mínim possible, i això depèn de la qualitat i rapidesa del termociclador emprat.

S'han realitzat reaccions d'amplificació per obtenir fragments concrets dels gens *gyrA* i *parC* d'*E. coli* i del gen *gyrA* de *S. typhimurium*, per seqüenciar-los. Aquests fragments corresponen a la regió QRDR de cada gen, on s'ha descrit la presència de les principals mutacions responsables de conferir resistència a les quinolones. Totes els “primers” utilitzats han sigut subministrats per la casa comercial GensetOligos, excepte els “primers” LoQRD.2 i E.coli/ParC.3 que eren de Roche Diagnostics, i les seves seqüències es detallen a la taula 3.6.

Per a utilitzar-los en les reaccions d'amplificació, s'han preparat alíquotes de 100 µl dels “primers”, a una concentració de 10 pmol/µl, diluint els “primers” concentrats en aigua ultrapura. Tant els concentrats com els diluïts s'han guardat congelats a -20°C.

Taula 3.6. “Primers” utilitzats en aquest treball.

Nom	Seqüència	Posició
UpQRD ^{a, d}	5'-TGTCGTTGGTGACGTAATCGG-3'	+204 ^f
LoQRD ^a	5'-GCGAGAATGGCTGCGCCATGC-3'	+292 ^f
E.coli/ParC.1 ^{b, e}	5'-AACTGGGCCTGAATGCCAGCG-3'	+152 ^g
E.coli/ParC.2 ^b	5'-CCATCAACCAGCGGATAACGG-3'	+305 ^g
UpSalQ ^c	5'-GAGATGGCCTGAAGCCGGTAC-3'	+113 ^h
LoSalQ ^c	5'-GGTCGGCATGACGTCCGGAAT-3'	+483 ^h
LoQRD.2 ^d	5'-GTCTCTTTTTTCGAGATCGGCC-3'	+425 ^f
E.coli/ParC.3 ^e	5'-CCCAGCTCGCTCAATAGCAGC-3'	+410 ^g

^a “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 89 pb del gen *gyrA* d'*E. coli*.

^b “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 154 pb del gen *parC* d'*E. coli*.

^c “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 371 pb del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

^d “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 222 pb del gen *gyrA* d'*E. coli*.

^e “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 259 pb del gen *parC* d'*E. coli*.

^f Posició de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte al punt d'inici de la traducció del gen *gyrA* d'*E. coli*.

^g Posició de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte al punt d'inici de la traducció del gen *parC* d'*E. coli*.

^h Posició de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte la punt d'inici de la traducció del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

Les reaccions d'amplificació s'han fet utilitzant el sistema ExpandTM High Fidelity PCR System de Roche Diagnostics i seguint les indicacions de la casa comercial, en un termociclador Mastercycler personal de Eppendorf i les condicions de les reaccions d'amplificació han sigut diferents per a cada cas. La temperatura a la que es realitza la fase d'anellament ve determinada per la temperatura de fusió (T_m) dels “primers” i normalment és 3 graus superior a la temperatura de fusió del “primer” que tingui la T_m més baixa. Donat que la T_m dels dos “primers” utilitzats per amplificar el fragment de 89 pb del gen *gyrA* d'*E. coli* era molt alta, s'ha triat una temperatura més baixa

per la fase d'anellament, amb la qual cosa s'han obtingut uns millors resultats. La longitud del fragment esperat defineix el temps de la fase d'elongació. Normalment es considera un minut per cada kilobase de grandària. Per amplificar el fragment del gen *gyrA* de *S. typhimurium* s'ha augmentat el temps de la fase d'elongació, obtenint-se també uns millors resultats. Les barreges de reacció així com les condicions de cada amplificació estan detallades a continuació.

Barreja de reacció:

Per a la majoria de reaccions s'ha preparat una barreja d'amplificació en un volum final de 100 µl, en tubs de 0,5 ml especials per a PCR i mantinguts sempre a 0°C. Seguidament s'ha repartit 25 µl de la barreja en 4 tubs especials per a PCR i s'han col·locat en el termociclador en les condicions de programació adequades per a que tingui lloc l'amplificació. Tot seguit s'indiquen els diferents components de la mescla de reacció:

tampó d'amplificació (PCR Buffer 10X with MgCl ₂) (Roche)	10 µl
barreja dels 4 dNTPs (10X) (Roche)	10 µl
“primer sense” (10 pmol/µl) (GensetOligos)	4 µl
“primer antisense” (10 pmol/µl) (GensetOligos)	4 µl
“Expand” DNA polimerasa (3,5 U/µl) (Roche)	0,8 µl
DNA (1 µg/µl)	0,8 µl (200 ng)
aigua ultrapura	70,4 µl

Una vegada finalitzada la reacció, s'han ajuntat els productes d'amplificació obtinguts en les quatre reaccions, s'ha procedit a fer una electroforesi i a recuperar i clonar el fragment per posteriorment seqüenciar-lo.

Per amplificar els fragments de 222 pb del gen *gyrA* i de 259 pb del gen *parC* d'*E. coli* s'han preparat barreges d'amplificació en un volum final de 50 μ l, adequant les quantitats anteriorment detallades a aquest volum. Aquests fragments amplificats s'han utilitzat per a seqüenciar-los, utilitzant un "primer" marcat, directament després de recuperar el producte de l'amplificació utilitzant el kit "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) i seguint el protocol facilitat per la casa comercial.

Quan s'han amplificat fragments a partir de DNA d'*E. coli*, previ a la reacció d'amplificació, s'ha fet un tractament amb l'enzim de restricció *DpnI* (Roche Diagnostics, 10 U/ μ l), seguint les indicacions facilitades per la casa comercial Roche Diagnostics. Així, la barreja de reacció sense el DNA i sense els "primers" s'ha tractat amb *DpnI* durant una hora a 37°C. Passat aquest temps, s'ha inactivat a 94°C durant 2 minuts, s'hi ha afegit el DNA i els "primers", i la mescla s'ha col·locat en el termociclador per tal de dur a terme la reacció d'amplificació.

Condicions d'amplificació:

Programa "ECQRD": Utilitzat per a l'amplificació d'un fragment de 89 pb de la regió QRDR del gen *gyrA* d'*E. coli*

2 minuts a 95°C

1 minut a 95°C (fase de desnaturalització)

1 minut a 65°C (fase d'anellament)

1 minut a 72°C (fase d'extensió)

Es repeteixen els 3 últims passos X30 cicles

7 minuts a 72°C (fase d'extensió final)

Es disminueix la temperatura fins a 4°C.

Es manté a aquesta temperatura indefinidament.

Programa “ECQRD.2”: Utilitzat per a l’amplificació d’un fragment de 222 pb de la regió QRDR del gen *gyrA* d’*E. coli*

2 minuts a 95°C

1 minut a 95°C (fase de desnaturalització)

1 minut a 61°C (fase d’anellament)

1 minut a 72°C (fase d’extensió)

Es repeteixen els 3 últims passos X30 cicles

7 minuts a 72°C (fase d’extensió final)

Es disminueix la temperatura fins a 4°C.

Es manté aquesta temperatura indefinidament.

Programa “ECPARC”: Utilitzat per a l’amplificació d’un fragment de 154 pb de la regió QRDR del gen *parC* d’*E. coli*

2 minuts a 95°C

1 minut a 95°C (fase de desnaturalització)

1 minut a 62°C (fase d’anellament)

1 minut a 72°C (fase d’extensió)

Es repeteixen els 3 últims passos X30 cicles

7 minuts a 72°C (fase d’extensió final)

Es disminueix la temperatura fins a 4°C.

Es manté aquesta temperatura indefinidament.

Programa “ECPARC.2”: Utilitzat per a l’amplificació d’un fragment de 259 pb de la regió QRDR del gen *parC* d’*E. coli*

2 minuts a 95°C

1 minut a 95°C (fase de desnaturalització)

1 minut a 66°C (fase d’anellament)

1 minut a 72°C (fase d’extensió)

Es repeteixen els 3 últims passos X30 cicles

7 minuts a 72°C (fase d’extensió final)

Es disminueix la temperatura fins a 4°C.

Es manté aquesta temperatura indefinidament.

Programa “SALQRD”: Utilitzat per a l'amplificació d'un fragment de 371 pb de la regió QRDR del gen *gyrA* de *S. typhimurium*

2 minuts a 95°C

1 minut a 95°C (fase de desnaturalització)

1 minut a 59°C (fase d'anellament)

2 minuts a 72°C (fase d'extensió)

Es repeteixen els 3 últims passos X30 cicles

7 minuts a 72°C (fase d'extensió final)

Es disminueix la temperatura fins a 4°C.

Es manté aquesta temperatura indefinidament.

3.6.8. Marcatge i seqüenciació de DNA

La seqüenciació de DNA s'ha fet pel mètode de terminació de cadena emprant dideoxinucleòtids. Aquesta metodologia es basa en la capacitat dels 2'-3' dideoxinucleòtids d'actuar com a finalitzadors de cadena. Aquests ddNTPs no tenen el grup 3' hidroxil i, per tant, no poden formar l'enllaç fosfodiéster necessari per la incorporació del següent deoxinucleòtid. D'aquesta manera, quan s'introdueixen en una cadena que s'està sintetitzant, bloquegen la seva elongació.

Per la seqüenciació, es porten a terme 4 reaccions d'amplificació independents. Totes elles contenen: DNA que actua com a motlle i que correspon el DNA que es vol seqüenciar, un cebador o iniciador d'uns 17-24 nucleòtids complementaris a un fragment de la cadena motlle, una barreja dels quatre deoxinucleòtids, també adequat (DNA Sequencing 5X Buffer) i la *Taq* DNA polimerasa (5 U/μl) que catalitza la reacció. A cada reacció s'afegeix, a més a més, un dideoxinucleòtid diferent (A, C, G o T). El volum final de la reacció es completa amb aigua ultrapura.

En totes les reaccions es generen una sèrie de fragments que han estat finalitzats per la incorporació del ddNTP corresponent. La concentració dels ddNTPs ha de ser l'adient perquè la freqüència d'incorporació permeti la formació de tots els fragments possibles. D'aquesta manera, la posició de cada deoxinucleòtid de la cadena motlle està representada per la grandària del fragment que ha incorporat el dideoxinucleòtid corresponent.

El clons de pGEM[®]-T amb l'insert que interessava seqüenciar s'han marcat utilitzant el kit "fmol[®] DNA Cycle Sequencing System" de Promega i seguint les indicacions del fabricant. S'han utilitzat els "primers" Directe (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') i Revers (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') marcats amb Cy5 en el seu extrem 5' i sintetitzats per Amersham Pharmacia Biotech. Aquests "primers" són homòlegs a regions properes al punt de clonació del vector i permeten la seqüenciació del que hi ha clonat en aquest punt.

Els fragments de 222 pb del gen *gyrA* i de 259 pb del gen *parC* d'*E. coli* amplificats i recuperats tal com s'ha explicat anteriorment, s'han marcat directament utilitzant també el kit "fmol[®] DNA Cycle Sequencing System" de Promega i seguint les indicacions del fabricant. Com a "primer" per al marcatge s'ha utilitzat, en cada cas, el mateix "primer" revers utilitzat per amplificar el fragment, LoQRD.2 i E.coli/ParC.3, respectivament, però marcat amb Cy5 en el seu extrem 5' i sintetitzat per Amersham Pharmacia Biotech.

Totes les mostres s'han processat pel sistema "ALF Express" i les seqüències obtingudes s'han comparat amb les seqüències dels gens *gyrA* i *parC* d'*E. coli* i del gen *gyrA* de *S. typhimurium*, respectivament, obtingudes dels bancs de dades.

3.7. MÈTODES DE DETECCIÓ DE MUTACIONS

3.7.1. Hibridació de colònies amb sondes específiques

Aquest mètode permet determinar quina o quines mutacions presenta una soca, a través de l'hibridació de colònies d'aquesta soca amb diferents sondes d'oligonucleòtids que detecten mutacions puntuals, és a dir, un simple canvi de nucleòtid. Per a "aplicar" aquest mètode no cal extreure el DNA cromosòmic ni cal disposar de cap aparell especial.

S'ha treballat amb sondes radioactives, marcades amb ^{33}P . Quan es treballa amb les concentracions més elevades de radioactivitat s'ha de fer en una instal·lació especial, destinada a tal fi, i sempre s'ha de treballar amb totes les mesures necessàries i seguint totes les normes de protecció radiològica.

3.7.1.1. Sondes utilitzades

Per a les hibridacions s'han utilitzat sondes sintetitzades per la casa comercial GensetOligos. Aquestes sondes s'han dissenyat de tal manera que contenen de 18 a 21 nucleòtids i estan centrades en la posició on es produeix el canvi de nucleòtid responsable de conferir resistència a determinats antimicrobians a la soca portadora d'aquest canvi. En algun cas, com el de la sonda "salvatge" dissenyada per detectar mutacions en la posició 83 del gen *gyrA* de *S. typhimurium*, la sonda no s'ha centrat en aquesta posició i està una mica desplaçada, per evitar la formació d'estructures secundàries.

Les sondes utilitzades, així com la seva seqüència, estan detallades a la taula 3.7.

Taula 3.7. Sondes utilitzades en la hibridació de colònies.

Nom	Seqüència	Característiques
Sondes d'<i>E. coli</i>		
E.coliSer83	5'-CATGGTGACT CG GCGGTCTAT-3'	Sonda "salvatge", centrada en la posició 83 del gen <i>gyrA</i>
E.coliLeu83	5'-CATGGTGACT TG GCGGTCTAT-3'	Sonda "mutant", centrada en la posició 83 del gen <i>gyrA</i>
E.coliAsp87	5'-GCGGTCTAT GAC ACGATCGTC-3'	Sonda "salvatge", centrada en la posició 87 del gen <i>gyrA</i>
E.ParCSer80	5'-CACGGCGAT AGC GCCTGTTAT-3'	Sonda "salvatge" (AGC), centrada en la posició 80 del gen <i>parC</i>
E.ParCSer80(T)	5'-CACGGCGAT AGT GCCTGTTAT-3'	Sonda "salvatge" (AGT), centrada en la posició 80 del gen <i>parC</i>
E.ParCGlu84	5'-GCCTGTTAT GA AGCGATGGTC-3'	Sonda "salvatge", centrada en la posició 84 del gen <i>parC</i>
C/E.coliSer83	5'-ATAGACCGC CG AGTCACCATG-3'	Sonda complementària "salvatge", centrada en la posició 83 del gen <i>gyrA</i>
C/E.coliLeu83	5'-ATAGACCGC CA AGTCACCATG-3'	Sonda complementària "mutant", centrada en la posició 83 del gen <i>gyrA</i>
C/E.coliAsp87	5'-GACGATCGT GTC ATAGACCGC-3'	Sonda complementària "salvatge", centrada en la posició 87 del gen <i>gyrA</i>
C/E.ParCSer80	5'-ATAACAGGC GCT ATCGCCGTG-3'	Sonda complementària "salvatge" (GCT), centrada en la posició 80 del gen <i>parC</i>
C/E.ParCSer80(T)	5'-ATAACAGGC ACT ATCGCCGTG-3'	Sonda complementària "salvatge" (ACT), centrada en la posició 80 del gen <i>parC</i>
C/E.ParCGlu84	5'-GACCATCGC TTC ATAACAGGC-3'	Sonda complementària "salvatge", centrada en la posició 84 del gen <i>parC</i>
Sondes de <i>S. typhimurium</i>		
SalSer83	5'-GGCGATT CCG CAGTGTAT-3'	Sonda "salvatge", desplaçada respecte a la posició 83 del gen <i>gyrA</i>
C/SalSer83	5'-ATACACTGC GGA ATCGCC-3'	Sonda complementària, desplaçada respecte a la posició 83 del gen <i>gyrA</i>

En negreta es mostra la posició concreta on s'ha detectat la mutació.

Pel marcatge de les sondes amb $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, s'han preparat alíquotes de 100 μl a una concentració de 10 pmol / 3 μl , diluint les sondes concentrades en aigua ultrapura. Tant les sondes concentrades com les diluïdes s'han guardat congelades a -20°C .

S'han dissenyat també sondes "complementàries" a aquestes per tal de posar-les directament en el filtre i per a que serveixin com a controls positius de DNA. Aquestes sondes també han estat sintetitzades per la casa comercial GensetOligos i es mostren també a la taula 3.7. Per a utilitzar-les com a controls, s'han preparat alíquotes de 50 μl , a una concentració de 50 pmol/ μl , diluint les sondes concentrades en aigua ultrapura. Tant les sondes concentrades com les diluïdes s'han guardat congelades a -20°C .

3.7.1.2. Marcatge de les sondes

Les sondes s'han marcat en el seu extrem 5' utilitzant el "5'-end labelling kit RPN 1509" i el radionúclid Redivue $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$, ≥ 2500 Ci/mmol, d'Amersham Pharmacia Biotech. Les reaccions s'han dut a terme segons el protocol descrit pel fabricant ("Marcatge de DNA sintètic"), amb algunes petites modificacions:

1. Afegir, en el següent ordre:

sonda (DNA sintètic 5'-OH) (10 pmols d'extrems 5')	3 μl
tampó de fosforilació 10X	1 μl
$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 mCi/ml)	5 μl
T4 PNK (PolyNucleotide Kinase) (10 unitats/ μl)	1 μl

2. Incubar a 37°C durant 30 minuts.

3. Inactivar l'enzim escalfant a 70°C durant 10 minuts.

4. Afegir 10 μl d'acetat d'amoni 7M.

5. Afegir 50 μl (2,5 volums) d'etanol fred i deixar a -80°C durant 30 minuts.

6. Centrifugar durant 10 minuts a 12000 rpm i eliminar el sobrenedant.
7. Rentar dues vegades amb 1 ml d'etanol al 70% fred.
8. Deixar assecar el sediment i resuspendre en 10 µl d'aigua ultrapura.

Les sondes marcades s'han purificat utilitzant les "ProbeQuant™ G-50 Micro Columns" d'Amersham Pharmacia Biotech, per tal d'eliminar l'excés de fòsfor no incorporat, seguint el protocol descrit per la casa comercial:

Preparació de la mostra:

1. Es duu a terme la reacció de marcatge segons el protocol descrit anteriorment.
2. Com el volum de la reacció de marcatge és inferior a 50 µl, ajustar-lo a aquest volum, afegint 40 µl de "STE buffer".

Preparació de les "ProbeQuant G-50 Micro Columns":

1. Resuspendre la resina que hi ha dins la columna amb el vòrtex.
2. Girar el tap un quart de volta i trencar la part inferior de la columna.
3. Posar la columna sobre un tub eppendorf com a suport.
4. Pre-centrifugar la columna durant un minut a 735 g.

**Condicions de centrifugació:* Abans d'utilitzar una "ProbeQuant G-50 Micro Column" és important calcular la velocitat a la que la columna haurà de ser centrifugada. Per a una força de 735 g, la velocitat adequada es pot calcular aplicant la següent fórmula:

$$\text{rpm} = (1000) (657/r)^{1/2}$$

on r = radi en mm del rotor de la centrífuga i rpm = revolucions per minut. Per exemple, amb un rotor de radi 73 mm, la velocitat adequada seria de 3000 rpm.

Aplicació de la mostra:

1. Posar la columna en un nou tub eppendorf i, amb molt de compte, aplicar els 50 µl de mostra en el centre de la part superior de la resina.
2. Centrifugar la columna a 735 g durant 2 minuts. La mostra purificada quedarà en el fons del tub eppendorf utilitzat com a suport.
3. Recuperar la mostra (sonda marcada) i transferir-la a un nou tub eppendorf.
4. Congelar les sondes marcades i purificades a -20°C fins a la seva utilització.

3.7.1.3. Preparació de les soques

Per a sembrar les colònies que després es transferiran als filtres, s'han utilitzat tant cultius de nit de les soques en 5 ml de medi LB, incubats a 37°C i en agitació, com els cultius de les soques congelats en plaques microtiter. S'han fet servir els mateixos protocols tant per a l'estudi de les soques d'*E. coli* com per al de les de *S. typhimurium*. En totes les plaques s'han sembrat, a més a més, colònies de soques conegudes com a controls positius i negatius d'hibridació.

S'han agafat 4 µl del cultiu de cada soca amb una micropipeta i s'ha sembrat sobre plaques de NB Agarosa, tan sols tocant l'agar amb l'extrem de la punta. Cada soca s'ha col·locat en una posició determinada i s'han marcat adequadament les plaques per tal de conèixer la posició exacta de cada soca. Les plaques, que normalment s'han preparat per duplicat, s'han incubat a 37°C tota la nit.

3.7.1.4. Transferència de les colònies als filtres

Un cop han crescut les colònies, s'ha seguit el següent protocol de transferència:

1. Refredar les plaques a 4°C durant 30 minuts.
2. Posar un filtre de paper Whatman 541 ("FILTER PAPERS 541", Whatman, 90 mm Ø) a sobre de cada placa, en una posició que sigui reconeixible. Prèviament, retallar una mica els filtres i marcar-los de forma asimètrica per a poder orientar-los. El filtre quedarà enganxat a la placa.
3. Pressionar amb un cilindre de fusta folrat de vellut, per tal que les colònies s'adhereixin al filtre. Per aconseguir una millor adherència, passar una nansa de Digiralski per sobre el filtre, des del centre cap els costats.
4. Agafar el filtre amb unes pinces Millipore perfectament netes i deixar-lo amb les colònies cap amunt sobre un paper 3MM ("Gel Blotting Paper", GB 002, Schleicher & Schuell) per a que s'assequi.
5. Col·locar el filtre en una placa de Petri de plàstic on prèviament s'hi haurà col·locat un cercle de paper 3MM saturat amb 5 ml de **solució de desnaturalització** durant 5 minuts.
6. Col·locar la placa destapada en un forn microones de 750 W a un terç de la potència i durant 30 segons, amb l'objectiu de llisar les cèl·lules.
7. Treure el filtre i assecar-lo breument sobre paper 3MM.
8. Col·locar el filtre en una placa de Petri de plàstic on prèviament s'hi haurà col·locat un cercle de paper 3MM saturat amb 5 ml de **solució de neutralització** durant 5 minuts.
9. Treure el filtre i assecar-lo sobre paper 3MM.
10. Col·locar 0,5 µl de "sonda complementària" (50 pmol/µl), en un punt concret del filtre, com a control positiu de DNA.
11. Fixar el filtre en el UV Stratalinker[®] 2400 (Stratagene).
12. Col·locar el filtre dins d'una bossa d'hibridació i segellar tots els costats.

Els filtres es poden guardar d'aquesta manera fins el moment de l'hibridació.

3.7.1.5. Determinació de la T_m de les sondes i de la temperatura d'hibridació

Per a determinar la **temperatura de fusió** (T_m) de cada sonda s'ha utilitzat la següent fórmula:

$$T_m = 81,5 + 16,5 \times \log[\text{Na}^+] + 0,41 \times (\%GC) - 675/l - 0,65 \times (\%formamida) - (\%mismatch)$$

(on l = longitud de l'oligonucleòtid, en pb).

S'ha utilitzat aquesta T_m calculada per a determinar la **temperatura d'hibridació** per a cada sonda. En la majoria dels casos, s'ha treballat a una temperatura d'hibridació uns 10°C per sobre la T_m . Abans de començar a hibridar tota la col·lecció de soques, però, s'han hibridat filtres amb soques conegudes com a controls. Això ha permès poder posar a punt totes les condicions i trobar la millor temperatura d'hibridació per a cada sonda. En alguns casos s'ha tingut que disminuir la temperatura d'hibridació calculada en un principi, uns 10°C per sobre la T_m , fins a obtenir els millors resultats, és a dir, trobar aquella temperatura d'hibridació que donés una bona hibridació tant amb els controls positius com negatius.

3.7.1.6. Hibridació

S'ha de tenir en compte que les sondes s'han marcat radioactivament, per tant s'ha de treballar sobre paper, amb protecció adequada i s'ha de tenir tot el material que s'utilitzarà perfectament marcat i separat. Tots els residus que entrin en contacte amb la sonda s'hauran de separar i tractar com residus radioactius. Un cop s'hagi acabat, s'haurà de netejar tot molt bé amb sabó segrestador de radioactivitat.

El protocol d'hibridació que s'ha posat a punt i s'ha utilitzat per estudiar la presència de mutacions que confereixen resistència a quinolones

en tota la col·lecció de soques d'*E. coli* i *S. typhimurium* es detalla a continuació:

1. Introduir 5 ml de **solució de prehibridació** preescalfada en la bossa d'hibridació, la qual conté el filtre, i a la que se li ha tallat un extrem. Eliminar les bombolles i segellar l'extrem obert.
2. Prehibridar durant 30 minuts a la temperatura d'hibridació determinada per a cada sonda, en un forn d'hibridació i amb rotació lenta.
3. Eliminar la solució de prehibridació, abocant el contingut de la bossa.
4. Afegir 5 ml de **solució d'hibridació** (solució de prehibridació + 1 µl/ml de sonda marcada), que s'haurà escalfat a 65°C durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar la sonda.
5. Eliminar les bombolles i segellar l'extrem obert.
6. Hibridar durant 2 hores a la temperatura d'hibridació determinada per a cada sonda, en un forn d'hibridació i amb rotació lenta.
7. Recuperar la solució d'hibridació de la bossa per poder-la reaprofitar. Aquesta solució es pot seguir utilitzant fins a que la sonda marcada ja no doni senyal.

3.7.1.7. Rentats

Els filtres, un cop hibridats, s'han rentat per tal d'eliminar les restes de sonda. El protocol de rentat es detalla a continuació:

1. Treure el filtre de la bossa i posar-lo dins un tub per a forn d'hibridació ("roller") de manera que la part que toqui les parets del tub sigui la part de darrera del filtre.
2. Afegir uns 50 ml de 3XSSC i posar el "roller" en el forn d'hibridació durant 30 minuts, a la mateixa temperatura a la que s'ha fet l'hibridació i amb rotació ràpida.
3. Eliminar el 3XSSC, afegir-n'hi de nou uns 50 ml i tornar-ho a posar en el forn durant 30 minuts més.

4. Eliminar el 3XSSC.
5. Treure el filtre del “roller” i deixar-lo assecar damunt de paper de filtre.

3.7.1.8. Exposició i revelat

Un cop els filtres han estat ben secs s’han col·locat, amb la cara on hi havia les colònies cap amunt, en una Hypercassette (Amersham Pharmacia Biotech) amb pantalles intensificadores Hyperscreen (Amersham Pharmacia Biotech) i s’hi ha col·locat a sobre una pel·lícula fotogràfica Biomax MR de Kodak, tenint en compte que la cara on hi ha l’emulsió quedés en contacte amb els filtres. S’ha tancat bé i s’ha guardat la Hypercassette dins una bossa negra. Tot aquest procediment s’ha fet a les fosques, en una cambra obscura il·luminada amb llum vermella, per tal d’evitar que es velés la pel·lícula. Els filtres s’han exposat d’aquesta manera durant unes 72 hores (o més, segons l’estat del ^{33}P) a -80°C .

Passat el temps d’exposició, s’ha tret la Hypercassette del congelador i s’ha deixat atemperar durant uns 15 minuts. Les pel·lícules s’han revelat també a les fosques. El protocol de revelat es detalla a continuació:

1. Treure la pel·lícula de la Hypercassette i submergir-la en una cubeta de plàstic amb **revelador** (“Neutol Liquid NE”, B & W Paper Developer, AGFA). S’ha treballat amb una dilució 1/5 del revelador: 400 ml de revelador concentrat en 1600 ml d’aigua destil·lada, que s’ha guardat protegit de la llum en una ampolla de vidre de 2 litres de capacitat.
2. Agafar la pel·lícula d’un extrem i anar-la movent dins el revelador fins a veure aparèixer el senyal dels filtres. Quan es decideix que ja hi ha prou senyal, treure la pel·lícula del revelador.
3. Submergir la pel·lícula en una cubeta de plàstic amb àcid acètic al 3% i anar-la movent durant uns 2-3 minuts.
4. A continuació, submergir la pel·lícula en una cubeta de plàstic amb **fixador** (“Agefix”, B & W Fixer, AGFA). S’ha treballat amb una dilució 1/5 del fixador: 400 ml de fixador concentrat en 1600 ml d’aigua destil·lada, que s’ha

guardat protegit de la llum en una ampolla de vidre de 2 litres de capacitat, i anar-la movent durant uns 2-3 minuts.

5. Introduir la pel·lícula dins una cubeta de plàstic amb aigua destil·lada.

6. Deixar assecar la pel·lícula, penjant-la amb unes pinces, a temperatura ambient.

3.7.2.9. Lectura dels resultats

Quan les plaques s'han assecat bé, s'han posat damunt un full de paper blanc per a poder "llegir" els resultats. S'ha tingut amb compte la hibridació amb els controls, tant positius com negatius, per decidir si una soca en concret ha hibridat o no amb una sonda determinada.

3.7.2. PCR a temps real per a la detecció fluorimètrica de les mutacions

La PCR a temps real (o "real-time PCR") permet detectar la formació dels productes de PCR al mateix temps que té lloc la reacció d'amplificació. La detecció d'aquests productes es fa a través de la utilització de diferents reactius fluorescents que s'uneixen de manera específica o no específica al DNA, de manera que mesurant aquest senyal fluorescent es pot monitoritzar la PCR. Si s'utilitzen sondes de DNA marcades, el senyal de PCR correspon específicament a l'amplificació de la diana. Es poden dissenyar, també, diferents sondes que ens permetin discriminar entre les variants salvatges i mutants d'un mateix gen. La PCR a temps real, doncs, permet obtenir dades genètiques al mateix temps que té lloc l'amplificació del DNA.

S'ha utilitzat aquest mètode, emprant un equip LightCycler de Roche Diagnostics, per a detectar les diferents mutacions que poden tenir lloc en la regió QRDR del gen *gyrA* de les soques de *S. typhimurium* estudiades. L'amplificació de la regió de DNA a analitzar s'aconsegueix usant els "primers" GyrA S i GyrA R, i la detecció de les mutacions gràcies a dues

sondes FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”) (Figura 3.1). Com es presenta en aquesta figura, les sondes FRET es dissenyen de tal manera que hibriden de forma adjacent en les seves regions complementàries. L’extrem 3’ d’una de les sondes, anomenada “Anchor”, està marcat amb fluoresceïna i l’extrem 5’ de l’altra sonda, o sonda “Sensor”, està marcat amb el fluoròfor Red-640. La sonda “Sensor” és la que hibrida amb la regió on es localitzen les mutacions que es pretenen detectar i, a més a més, presenta el seu extrem 3’ fosforil·lat, per evitar l’amplificació a partir d’aquesta sonda. Quan el sistema activa la fluoresceïna, provoca l’activació del fluoròfor adjacent, que emet fluorescència a una determinada longitud d’ona; en aquest cas, a 640 nm. L’emissió d’un senyal a 640 nm té lloc només si la sonda està unida a la seva diana específica.

La determinació es realitza en el mateix tub de PCR on s’hi afegeixen els “primers” (GyrA S i GyrA R) i les dues sondes FRET (GyrA Anchor i Sensor). Al finalitzar l’amplificació, es realitza un pas de fusió o “melting” per conèixer la T_m del producte amplificat hibridat amb les sondes FRET. Si no hi ha cap desaparellament, la T_m esperada serà més alta que la que s’obtidria si l’homologia no fos total, ja que tan sols un desaparellament provocaria una major inestabilitat de l’híbrid, amb la qual cosa la sonda “Sensor” es separaria de la seva diana, i per tant deixaria d’emetre fluorescència, a una temperatura més baixa que quan l’aparellament fos perfecte. Per tant, s’obtidran diferents valors de T_m en funció de la total o parcial complementarietat de la sonda “Sensor” amb la regió de DNA amplificada.

Tant els “primers” com les sondes FRET utilitzades en aquest treball han sigut dissenyats per Olfert Landt i sintetitzats per TIB MOLBIOL (DNA Synthesis Service; Roche Diagnostics, Berlin, Germany), detallant-se les seves seqüències a la taula 3.8. La sonda “Sensor” conté la seqüència salvatge de la regió on estan els codons 83 i 87 del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

MATERIALS I MÈTODES

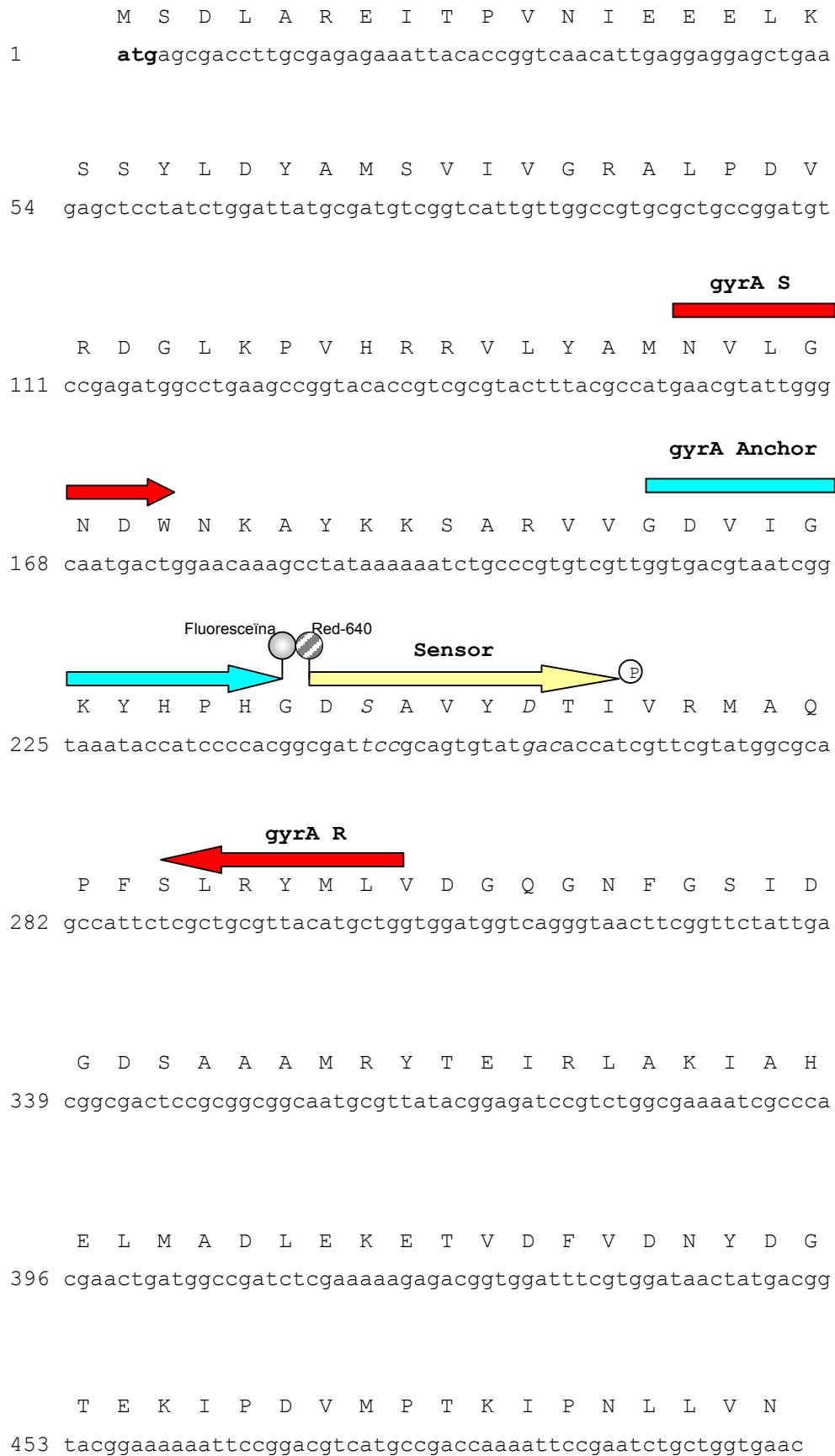


Fig. 3.1. Regió N-terminal del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

Taula 3.8. “Primers” i sondes utilitzades en el mètode de PCR a temps real per a detectar mutacions en el gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

Nom de la sonda	Seqüència	Posició	T _m ^e
GyrA S ^a	5'-GAACGTATTGGGCAATGACT-3'	+156 ^d	53,8°C
GyrA R ^a	5'-CAGCATGTAACGCAGCGA-3'	+306 ^d	56,9°C
GyrA Anchor ^b	5'-GGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCAC-3'	+211 ^d	67,5°C
Sensor ^c	5'-CGATT CCGCAGTGTATGACACCA -3'	+243 ^d	62,3°C

^a “Primers” utilitzats per amplificar un fragment de 151 pb del gen *gyrA* de *S. typhimurium*

^b Sonda “Anchor”, marcada amb fluoresceïna en el seu extrem 3'

^c Sonda “Sensor”, marcada amb el fluoròfor Red-640 en el seu extrem 5' i fosforil·lada en el seu extrem 3' (en negreta s'indiquen els codons codificants per les posicions 83 i 87 del gen *gyrA* de *S. typhimurium*, en aquest cas corresponents al gen salvatge)

^d Posició de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte la punt d'inici de la traducció del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

^e Les T_m's de les sondes “Anchor” i “Sensor” interessa que siguin bastant diferents entre elles per a que es pugui apreciar la diferència entre les soques salvatges i les soques mutants.

Les reaccions s'han dut a terme en tubs capil·lars en un “LightCycler instrument” de Roche Diagnostics, utilitzant el kit “LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes” (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) i seguint les instruccions facilitades per la casa comercial. S'han fet, però, algunes modificacions per tal d'adaptar el protocol a les necessitats de l'estudi en concret.

Barreja de reacció:

Volum final: 10 µl → 8 µl de MIX + 2 µl de DNA cromosòmic (20 ng)

		Concentració final
MIX: aigua ultrapura	2,6 µl	
MgCl ₂	1,6 µl	5 mM
“primer up” (gyrA S)	0,5 µl	0,05 µM
“primer low” (gyrA R)	1 µl	1 µM
gyrA Anchor	0,65 µl	0,2 µM
Sensor	0,65 µl	0,2 µM
barreja “Master”	1 µl	

Es tracta d'una PCR asimètrica, en la que s'ha afegit molta més quantitat del “primer low” que del “primer up”, per tal d'afavorir l'amplificació a partir del “primer low” i, per tant, la unió de les sondes a les seves dianes.

Condicions de reacció:

A la taula 3.9 s'indiquen les condicions utilitzades en els experiments. El primer pas de desnaturalització serveix per activar l'enzim FastStart. La PCR consisteix en 45 cicles amb els següents passos: 95°C durant 10 segons, 57°C durant 10 segons i 72°C durant 7 segons (la temperatura de la fase d'anellament, 57°C, s'ha triat de 3 graus per sobre de la T_m més baixa dels dos “primers”). Seguidament té lloc un pas de “melting” en el que la temperatura s'augmenta ràpidament fins a 95°C i immediatament es disminueix fins a 52°C, on es manté durant 15 segons. Passat aquest temps, la temperatura es torna a augmentar fins a 95°C, però ara molt lentament (0,1°C/segon). En aquest últim pas és en el que té lloc la mesura contínua de la fluorescència, per a determinar la T_m de la sonda Sensor. Finalment, té lloc un pas de “refredament” després del qual ja es pot obrir l'aparell.

Taula 3.9. Condicions utilitzades per a detectar mutacions en el gen *gyrA* de *S. typhimurium* per PCR a temps real.

Program:	Desnaturalització		Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	
1	95	600	20	

Program:	Amplificació		Cycles	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	
1	95	10	20	
2	57	10	20	
3	72	7	20	

Program:	Melting		Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	
1	95	0	20	
2	52	15	20	
3	95	0	0,1	

Program:	Cooling		Cycles	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	
1	40	30	20	

3.8. BASES DE DADES

Per tal de poder accedir fàcilment a tota la informació recopilada sobre cadascuna de les soques estudiades, s'ha utilitzat el programa "Microsoft Access" per a crear una base de dades d'*E. coli* i una altra de *S. typhimurium*.

En elles s'ha inclòs tant la informació proporcionada pel laboratori de Sanitat Animal i per l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau referent al nom, procedència, origen i data d'aïllament de cada soca, així com totes les dades presentades en aquesta memòria de CMI_s, seqüenciació i hibridació. En la base de dades de *S. typhimurium* s'hi han afegit també les dades de T_m obtingudes amb el LightCycler.

A més d'accedir fàcilment a tota aquesta informació, aquest programa permet fer consultes específiques combinant diferents paràmetres, així es poden conèixer ràpidament totes les soques que presenten unes determinades característiques. Aquestes bases de dades es presenten en el CD adjunt a aquesta memòria.

4. RESULTATS

4. RESULTATS

Seguidament es presenten els resultats obtinguts sobre les diferents característiques que s'han estudiat tant de les soques d'*E. coli* com de les de *S. typhimurium*. Cal indicar que aquests estudis, dins cada grup de soques, s'han realitzat de forma independent, amb l'objectiu d'analitzar amb posterioritat si es podia establir alguna relació entre els resultats obtinguts.

Donat que els objectius proposats en aquest treball han sigut diferents per a *E. coli* i *S. typhimurium*, aquest capítol s'ha subdividit en dues parts. Així, a la part A es mostren els resultats obtinguts amb *E. coli* i a la part B es detallen els de *S. typhimurium*.

PART A. *Escherichia coli*

4.1. CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES

S'ha estudiat tot el conjunt de soques d'*E. coli*, tant les d'origen animal com les aïllades d'humans (Taules 3.1 i 3.2), mitjançant la tècnica de Cinètiques Bioquímiques (CB). Amb l'objectiu de conèixer el grau amb el que estan relacionades, s'ha utilitzat el sistema automàtic Vitek i s'han construït els dendogrames de similituds relatives (SR) en funció de les CB obtingudes, emprant per a tal fi un programa informàtic (Badiola, 2000). S'ha establert el punt de tall en el 95%, per ser d'aquesta manera com s'han obtingut els millors resultats a l'hora d'agrupar soques d'*E. coli* d'origen animal, tenint en compte la procedència de les mostres i el seu any d'aïllament (I. Badiola, comunicació personal).

Per tal de visualitzar més clarament si hi ha alguna relació entre els paràmetres animal i any d'aïllament i els grups de relació que s'obtenen, s'han obtingut, per a les soques d'origen animal, els dendogrames que es mostren a les figures 4.1 i 4.2. En aquests dendogrames cada soca s'indica

amb el seu codi, l'any d'aïllament i l'animal del qual va ser aïllada. Per exemple, la soca d'origen animal denominada "AT_030_00 [Au]" és una soca aïllada d'au ([Au]) l'any 2000 (_00) i a la que es va assignar el codi AT_030. Els dendogrames de les figures 4.1 i 4.2 difereixen en que en el primer un mateix color en el nom de les soques indica que van ser aïllades del mateix tipus d'animal, mentre que en el segon indica que van ser aïllades en el mateix any.

A l'analitzar els dos dendogrames es pot observar que les soques d'*E. coli* d'origen animal estan força relacionades entre elles, tant des del punt de vista del tipus d'animal del qual es van aïllar (au, boví, conill o porc), com des del punt de vista de l'any d'aïllament. En aquests dendogrames es pot veure clarament que els grups de soques amb valors de SR superiors al 95% solen ser de soques procedents del mateix tipus d'animal i aïllades el mateix any. És a dir, les soques aïllades d'aus, per exemple, es relacionen preferentment amb altres aïllades també d'aus i, en la majoria dels casos, aïllades el mateix any. Malgrat aquesta tendència, es poden observar també grups de soques molt semblants entre elles que han sigut aïllades en anys diferents i a partir d'espècies animals diferents.

De la mateixa manera, a les figures 4.3 i 4.4 hi ha representats els dendogrames obtinguts per a les soques d'*E. coli* d'origen humà. A l'igual que en el cas anterior, cada soca s'indica amb el seu codi, l'any d'aïllament, el tipus de mostra de la qual va ser aïllada i si és de procedència intra o extrahospitalària. D'algunes soques, però, es desconeix aquesta dada i això s'ha indicat com a N.D. (procedència no determinada). En el dendograma de la figura 4.3 el fet que les soques s'assenyalin amb el mateix color indica que la seva procedència és la mateixa, mentre que en el dendograma de la figura 4.4 indica que el que tenen en comú és l'any d'aïllament.

En aquests dos dendogrames es pot observar que les soques d'origen humà estan, en general, menys relacionades entre elles que les soques d'origen animal, ja que la majoria de soques tenen valors de SR inferiors al 95%.

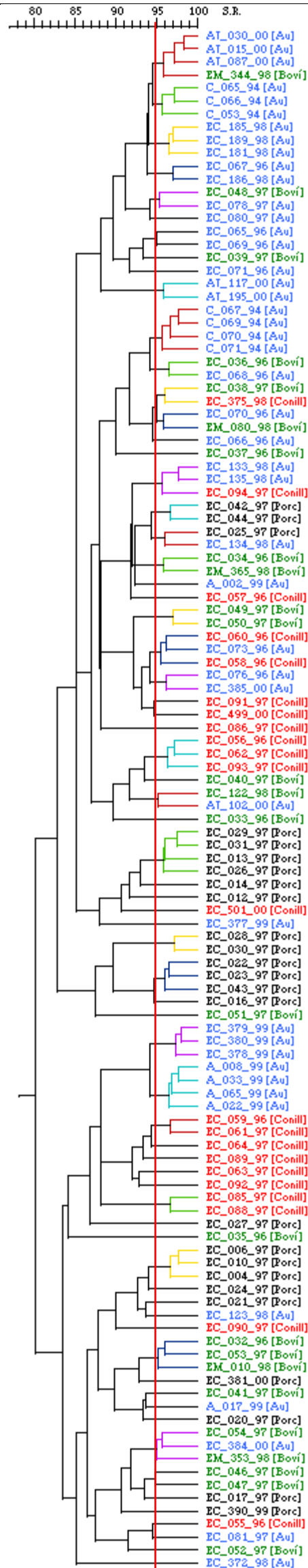


Figura 4.1. Dendrograma de similituds relatives i tipus d'animal per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animal.

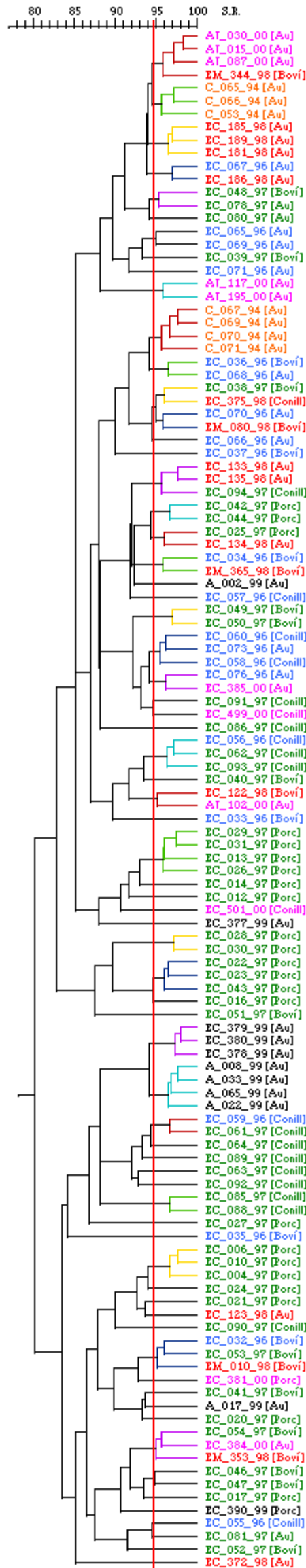


Figura 4.2. Dendrograma de similituds relatives i any d'aïllament per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animal.

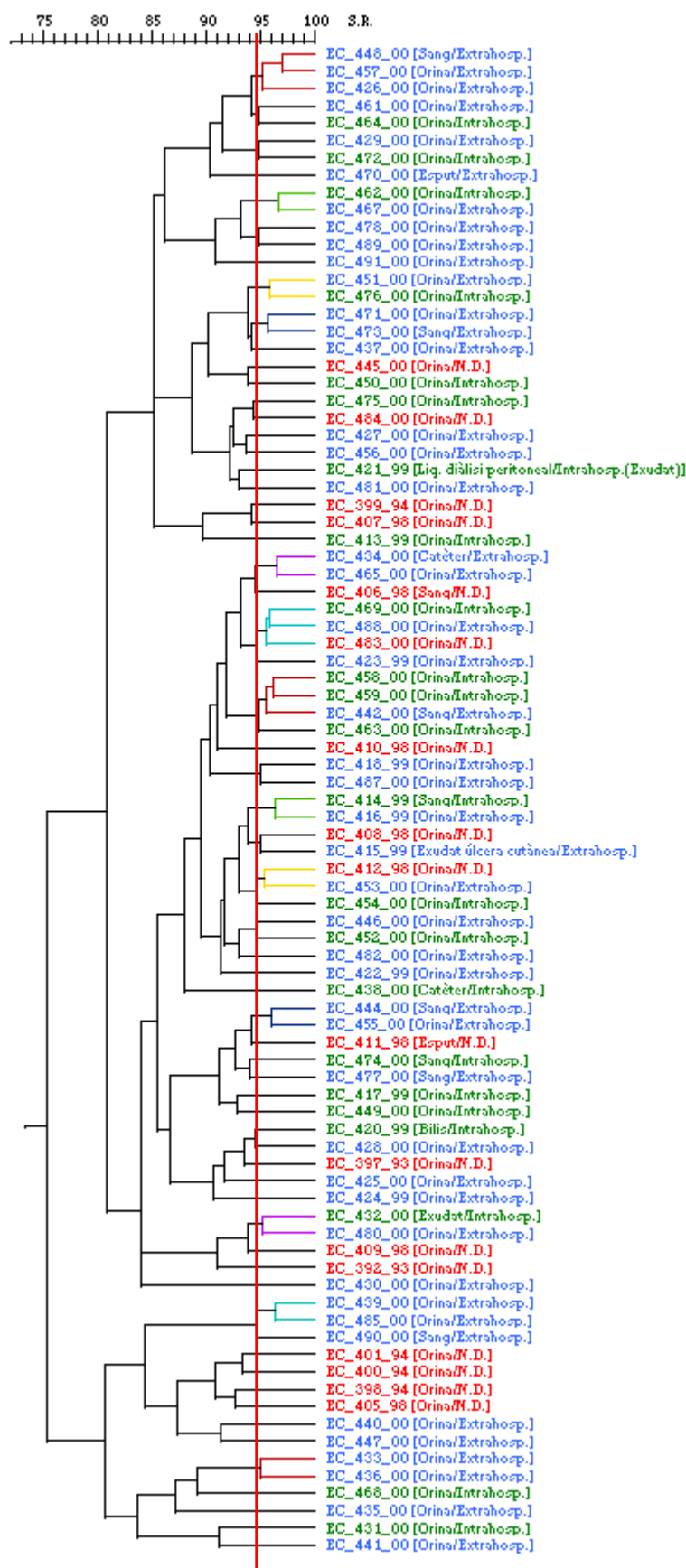


Figura 4.3. Dendograma de similituds relatives i procedència de les mostres per a les soques d'*E. coli* aïllades d'humans.

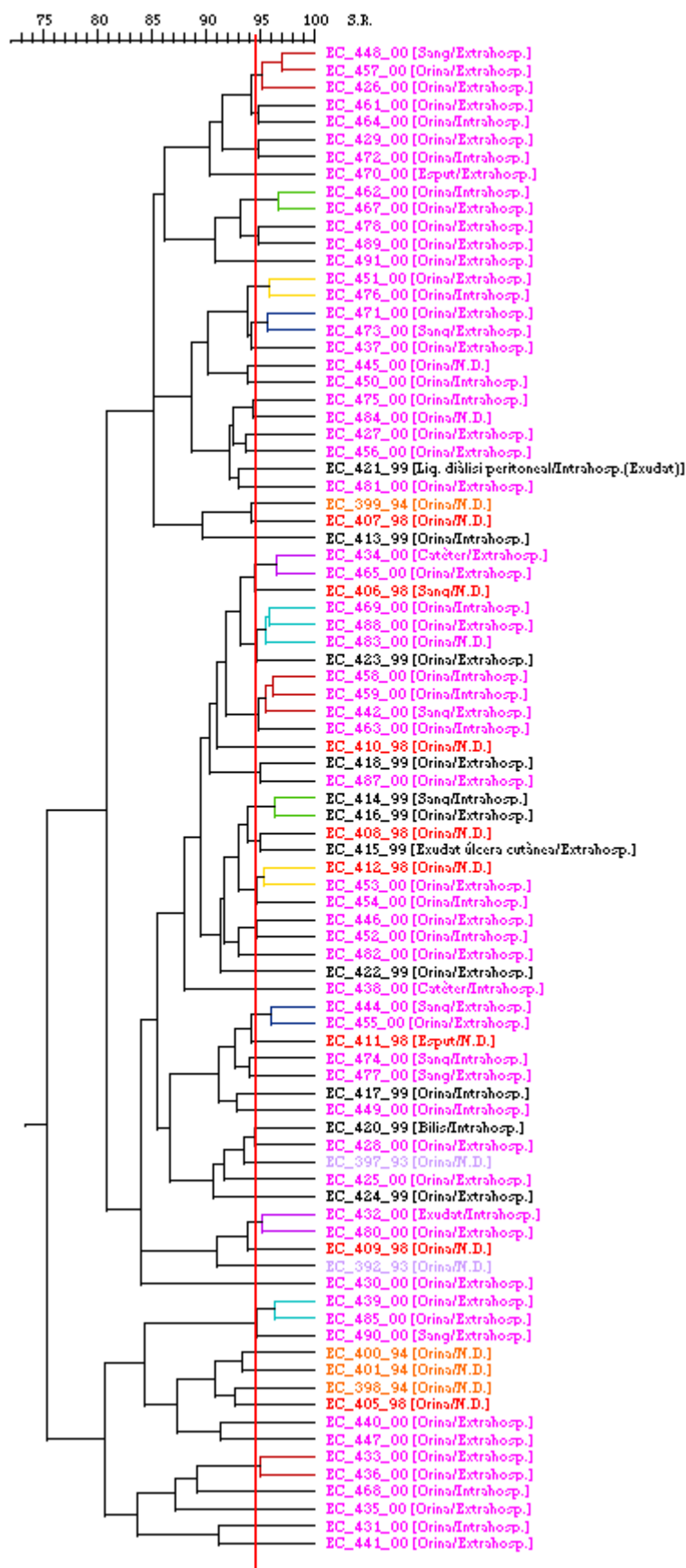


Figura 4.4. Dendrograma de similituds relatives i any d'aïllament per a les soques d'*E. coli* aïllades d'humans.

Donat que les soques d'*E. coli* d'origen humà estudiades procedeixen bàsicament de mostres d'orina de l'any 2000 (un 59,09% de les soques), no es pot observar la clara diferenciació segons el tipus de mostra i l'any d'aïllament comentada per a les d'origen animal. De totes maneres, quan s'analitzen les soques segons l'any d'aïllament, s'aprecia que la majoria de soques aïllades en anys anteriors al 2000 no s'agrupen entre elles sinó que es troben incloses en grups amb soques aïllades en altres anys. El mateix s'aprecia si es mira, en qualsevol dels dos dendogrames, el tipus de mostra del que van ser aïllades aquestes soques. Els pocs aïllats de mostres diferents a l'orina no s'agrupen entre ells, formant grups separats, sinó que queden relacionats bàsicament amb aïllats de mostres d'orina. No s'observa tampoc una clara influència del fet que la mostra sigui de procedència intra o extrahospitalària, és a dir, les soques de procedència intrahospitalària, per exemple, no s'agrupen totes entre elles formant grups separats sinó que es relacionen tant amb altres soques de procedència intrahospitalària com amb soques de procedència extrahospitalària.

4.2. SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES

Amb l'objectiu de conèixer la susceptibilitat a quinolones de les soques d'*E. coli*, s'han realitzat antibiogrames mitjançant el mètode de difusió amb discs impregnats d'antibiòtics. S'han assajat quatre antimicrobians d'aquesta família: àcid nalidíxic, norfloxacina, enrofloxacina i ciprofloxacina. A les taules 4.1 i 4.2 es mostren les concentracions mínimes inhibidores (CMI_s), en µg/ml, obtingudes per a totes les soques d'*E. coli* d'origen animal i humà, respectivament. Per a les soques d'origen animal (Taula 4.1) es mostren les dades obtingudes amb als quatre compostos, mentre que per a les d'humans (Taula 4.2) s'indiquen només les corresponents a les tres fluoroquinolones, ja que totes són resistents a l'àcid nalidíxic, presentant uns valors de CMI superiors a 342,64 µg/ml, exceptuant la soca EC-435 per la que aquest valor és tan sols de 131,48 µg/ml. En

aquestes taules s'han destacat, en negreta, aquells valors de CMI que indiquen resistència a una quinolona en concret.

Taula 4.1. Concentració Mínima Inhibitòria de les diferents quinolones per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animals.

Soca	CMI (µg/ml)			
	NAL	NOR	ENR	CIP
C-53	≥ 342,64	1,35	1,16	0,80
C-65	≥ 342,64	0,51	0,29	0,42
C-66	≥ 342,64	0,20	0,29	0,40
C-67	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	16,71
C-69	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	12,02
C-70	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	14,02
C-71	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	17,79
EC-32	3,73	0,27	0,05	0,06
EC-33	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-34	≥ 342,64	1,35	1,16	0,80
EC-35	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-36	106,53	0,27	0,22	0,27
EC-37	12,97	0,20	0,39	0,07
EC-55	7,21	0,10	0,16	0,02
EC-56	2,43	0,04	0,04	0,02
EC-57	2,16	0,06	0,07	0,01
EC-58	139,91	0,27	0,04	0,07
EC-59	≥ 342,64	3,36	2,18	1,41
EC-60	27,88	0,14	0,09	0,19
EC-65	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-66	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	7,05
EC-67	≥ 342,64	4,61	2,18	1,01
EC-68	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	19,36
EC-69	≥ 342,64	1,31	0,52	0,85
EC-70	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-71	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-73	≥ 342,64	0,70	0,69	0,60
EC-76	≥ 342,64	0,51	0,29	1,11
EC-4	≥ 342,64	1,52	1,06	0,13
EC-6	≥ 342,64	2,33	0,76	0,29
EC-10	≥ 342,64	2,53	0,73	0,98
EC-12	≥ 342,64	1,31	0,29	0,39
EC-13	≥ 342,64	4,61	5,15	0,68
EC-14	≥ 342,64	≥ 57,35	16,33	17,68
EC-16	177,23	0,27	0,52	0,20
EC-17	7,55	0,27	0,12	0,07
EC-20	≥ 342,64	6,31	1,23	1,27
EC-21	≥ 342,64	3,36	2,91	1,17
EC-22	≥ 342,64	≥ 57,35	5,15	16,50
EC-23	≥ 342,64	≥ 57,35	9,19	7,56
EC-24	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-25	≥ 342,64	8,66	1,63	1,25
EC-26	≥ 342,64	8,66	1,15	1,32
EC-27	≥ 342,64	8,66	2,18	0,87
EC-28	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	4,89
EC-29	≥ 342,64	16,26	5,15	1,97
EC-30	≥ 342,64	≥ 57,35	16,33	10,51

Taula 4.1. continuació

Soca	CMI (µg/ml)			
	NAL	NOR	ENR	CIP
EC-31	≥ 342,64	4,61	1,63	1,88
EC-38	4,90	0,10	0,05	0,03
EC-39	69,38	0,94	0,13	0,06
EC-40	21,70	0,35	0,21	0,08
EC-41	3,77	0,09	0,03	0,02
EC-42	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-43	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	14,47
EC-44	≥ 342,64	22,28	5,15	17,63
EC-46	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-47	18,16	0,08	0,09	0,10
EC-48	2,32	0,10	0,09	0,03
EC-49	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	24,96
EC-50	≥ 342,64	0,51	0,52	0,72
EC-51	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-52	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-53	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-54	6,08	0,20	0,16	0,03
EC-61	≥ 342,64	0,70	0,69	0,35
EC-62	6,14	0,08	0,09	0,04
EC-63	180,45	0,51	0,92	0,17
EC-64	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	4,41
EC-78	≥ 342,64	0,70	0,92	0,61
EC-80	≥ 342,64	≥ 57,35	3,88	3,95
EC-81	≥ 342,64	0,27	0,16	0,16
EC-85	≥ 342,64	0,95	0,39	0,43
EC-86	11,45	0,06	0,05	0,07
EC-88	≥ 342,64	0,51	0,22	0,40
EC-89	≥ 342,64	0,51	0,39	0,36
EC-90	≥ 342,64	6,31	1,63	1,54
EC-91	11,36	0,08	0,05	0,04
EC-92	≥ 342,64	0,70	0,39	0,78
EC-93	7,30	0,06	0,04	0,03
EC-94	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-122	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-123	≥ 342,64	1,37	0,72	0,50
EC-133	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-134	≥ 342,64	0,70	0,92	0,21
EC-135	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-181	≥ 342,64	16,00	3,99	3,35
EC-185	≥ 342,64	9,05	3,86	2,88
EC-186	≥ 342,64	26,50	15,68	10,81
EC-189	≥ 342,64	11,35	3,91	2,78
EC-372	≥ 342,64	7,07	1,29	2,80
EC-375	23,05	1,61	0,09	0,41
EM-010	38,50	1,20	0,50	0,31
EM-080	33,32	1,78	1,08	0,58
EM-344	19,32	1,76	1,02	0,50
EM-353	25,53	1,71	0,57	0,43
EM-365	30,82	0,57	0,60	0,27
A-002	≥ 342,64	3,65	0,50	0,69
A-008	6,60	0,17	0,04	0,03
A-017	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
A-022	6,72	0,19	0,10	0,03
A-033	5,69	0,11	≥ 38,67	0,05
A-065	6,15	0,16	0,02	0,03
EC-377	18,30	0,51	0,19	0,32
EC-378	6,53	0,20	0,04	0,06

Taula 4.1. continuació

Soca	CMI (µg/ml)			
	NAL	NOR	ENR	CIP
EC-379	4,56	0,17	0,82	0,03
EC-380	10,30	0,25	0,98	0,05
EC-390	17,94	0,43	0,48	0,11
AT-015	20,73	0,35	0,52	0,34
AT-030	18,64	0,20	0,36	0,20
AT-087	22,19	0,42	0,58	0,35
AT-102	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	18,94
AT-117	≥ 342,64	0,13	1,14	0,30
AT-195	≥ 342,64	0,39	0,10	0,03
EC-381	≥ 342,64	3,90	1,99	2,10
EC-384	≥ 342,64	≥ 57,35	20,61	10,05
EC-385	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	16,35
EC-499	≥ 342,64	3,29	0,89	0,75
EC-501	≥ 342,64	2,79	0,45	0,70

NAL: Àcid Nalidíxic; NOR: Norfloxacin; ENR: Enrofloxacin; CIP: Ciprofloxacin

NAL S: ≤13,88 NAL I: >13,88-<37,80 NAL R: ≥37,80

NOR S: ≤6,31 NOR I: >6,31-<16,25 NOR R: ≥16,25

ENR S: ≤1,63 ENR I: >1,63-<5,16 ENR R: ≥5,16

CIP S: ≤1,36 CIP I: >1,36-<4,79 CIP R: ≥4,79

(S: sensible, I: intermig, R: resistent)

Taula 4.2. Concentració Mínima Inhibitòria de les diferents fluoroquinolones per a les soques d'*E. coli* aïllades d'humans.

Soca	CMI (µg/ml)		
	NOR	ENR	CIP
EC-392	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-397	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-398	16,21	≥ 38,67	7,53
EC-399	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-400	≥ 57,35	≥ 38,67	4,24
EC-401	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-405	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-406	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-407	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-408	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-409	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-410	≥ 57,35	≥ 38,67	11,29
EC-411	≥ 57,35	≥ 38,67	7,61
EC-412	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-413	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-414	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-415	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-416	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-417	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
EC-418	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08

Taula 4.2. continuació

Soca	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	NOR	ENR	CIP
EC-420	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-421	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-422	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-423	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-424	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-425	4,06	1,24	0,79
EC-426	0,73	0,75	0,28
EC-427	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-428	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-429	2,47	1,22	1,34
EC-430	1,09	1,82	0,87
EC-431	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-432	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-433	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-434	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	8,51
EC-435	1,38	0,92	0,52
EC-436	7,65	3,36	3,92
EC-437	1,71	0,97	0,82
EC-438	5,28	2,85	2,16
EC-439	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-440	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-441	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-442	8,39	8,00	5,06
EC-444	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	25,44
EC-445	3,39	1,70	0,85
EC-446	5,36	6,18	1,36
EC-447	12,92	4,16	1,86
EC-448	2,82	1,22	0,86
EC-449	14,47	1,71	2,59
EC-450	0,85	2,48	0,85
EC-451	4,64	0,65	0,77
EC-452	14,93	4,13	3,79
EC-453	8,77	1,33	2,20
EC-454	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-455	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	18,36
EC-456	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-457	3,49	2,35	1,04
EC-458	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-459	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	17,57
EC-461	3,78	0,86	0,52
EC-462	4,77	2,00	1,73
EC-463	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-464	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-465	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	17,90
EC-467	2,58	3,94	1,70
EC-468	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	12,52
EC-469	1,76	0,92	0,44
EC-470	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-471	2,86	0,40	1,00
EC-472	2,74	2,84	0,81
EC-473	1,07	0,37	0,32
EC-474	2,38	0,64	0,56
EC-475	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	9,50
EC-476	3,05	1,02	0,43
EC-477	1,13	1,38	0,48
EC-478	3,38	2,23	0,87
EC-480	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$

Taula 4.2. continuació

Soca	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	NOR	ENR	CIP
EC-481	2,68	2,21	1,07
EC-482	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-483	4,22	2,56	0,96
EC-484	2,86	1,16	1,08
EC-485	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-486	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-487	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-488	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-489	2,41	1,66	0,72
EC-490	$\geq 57,35$	$\geq 38,67$	$\geq 43,08$
EC-491	2,01	1,52	2,30

NOR: Norfloxacina; ENR: Enrofloxacina; CIP: Ciprofloxacina

NOR S: $\leq 6,31$ NOR I: $>6,31-16,25$ NOR R: $\geq 16,25$

ENR S: $\leq 1,63$ ENR I: $>1,63-5,16$ ENR R: $\geq 5,16$

CIP S: $\leq 1,36$ CIP I: $>1,36-4,79$ CIP R: $\geq 4,79$

(S: sensible, I: intermig, R: resistent)

Els valors de CMI obtinguts s'han utilitzat per a classificar les soques estudiades segons la seva susceptibilitat a les diferents quinolones, distingint tres categories: R (resistent), I (intermig) i S (sensible). Com s'observa a la taula 4.3, la major part de les soques d'origen animal (71,19%) són resistents a l'àcid nalidíxic, mentre que un 17,79% són sensibles i un 11,02% mostra un nivell de susceptibilitat intermig. També s'observa que més d'un 60% són sensibles a alguna de les tres fluoroquinolones assajades i només al voltant d'un 30% són resistents a algun d'aquests antimicrobians.

Quan es comparen les soques d'*E. coli* Nal^R d'origen animal i humà (Taula 4.4) pel que fa a la seva susceptibilitat a les fluoroquinolones, s'observa que més d'un 45% de les aïllades d'animal són sensibles a algun d'aquests compostos i al voltant d'un 40% són resistents a algun d'aquests antimicrobians. En canvi, amb les soques procedents d'humans s'observa que només entre un 20 i un 30% són sensibles a alguna de les tres fluoroquinolones, mentre que al voltant d'un 60% són resistents.

Taula 4.3. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons la susceptibilitat a les quinolones.

	Susceptibilitat (CMI, µg/ml)	No. de soques	%
Àcid nalidíxic	R (≥37,80)	84	71,19
	I (>13,88-<37,80)	13	11,02
	S (≤13,88)	21	17,79
Norfloxacin	R (≥16,25)	37	31,36
	I (>6,31-<16,25)	7	5,93
	S (≤6,31)	74	62,71
Enrofloxacin	R (≥5,16)	34	28,81
	I (>1,63-<5,16)	13	11,02
	S (≤1,63)	71	60,17
Ciprofloxacin	R (≥4,79)	34	28,81
	I (>1,36-<4,79)	11	9,32
	S (≤1,36)	73	61,86

(**R**: resistent, **I**: intermig, **S**: sensible)

Taula 4.4. Distribució de les soques d'*E. coli* NaI^R segons la susceptibilitat a les fluoroquinolones.

		ORIGEN ANIMAL (Total: 84)		ORIGEN HUMÀ (Total: 88)	
Susceptibilitat (CMI, µg/ml)		No. de soques	%	No. de soques	%
Norfloxacinà	R (≥16,25)	37	44,05	52	59,09
	I (>6,31-<16,25)	7	8,33	7	7,95
	S (≤6,31)	40	47,62	29	32,95
Enrofloxacinà	R (≥5,16)	33	39,28	55	62,50
	I (>1,63-<5,16)	13	15,48	16	18,18
	S (≤1,63)	38	45,24	17	19,32
Ciprofloxacinà	R (≥4,79)	34	40,48	53	60,23
	I (>1,36-<4,79)	11	13,09	10	11,36
	S (≤1,36)	39	46,43	25	28,41

(**R**: resistent, **I**: intermig, **S**: sensible)

Per altra banda, és de destacar que els resultats de les taules 4.1 i 4.2 indiquen que, en la majoria dels casos, les soques resistents a una fluoroquinolona ho són també a les altres dues i que les soques d'origen animal sensibles o amb valors de resistència intermitjos a l'àcid nalidíxic són bàsicament sensibles a les tres fluoroquinolones.

Per tal de conèixer si hi ha diferències en la susceptibilitat a quinolones segons la procedència de les mostres o segons l'any en el que van ser aïllades, s'han analitzat aquestes dades combinant, doncs, diferents paràmetres. A la taula 4.5 es mostra la distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons el tipus d'animal del que s'aïllaren i la seva susceptibilitat a les quinolones. És de destacar que els percentatges més alts de soques resistents a l'àcid nalidíxic es troben entre les aïllades de porc i d'au; que, en general, entre les procedents de conill es troben els percentatges més alts de soques sensibles a les fluoroquinolones; i que d'entre les soques aïllades de boví no n'hi ha cap amb nivells de susceptibilitat intermitjos a les fluoroquinolones. A la taula 4.6 es mostra la distribució de les resistents a l'àcid nalidíxic, també segons el tipus d'animal del que van ser aïllades i la seva susceptibilitat a les quinolones. En aquesta distribució es segueix observant que els percentatges de soques sensibles a les fluoroquinolones són més alts entre les aïllades de conill i a més que entre les soques resistents a l'àcid nalidíxic aïllades de boví es troben els percentatges més alts de resistents a les fluoroquinolones.

Pel que fa a la relació entre la susceptibilitat a quinolones i l'any d'aïllament, a la taula 4.7 s'aprecia que totes les soques aïllades l'any 1994 són resistents a l'àcid nalidíxic i que el percentatge de resistents a les fluoroquinolones és superior al de les soques aïllades els anys posteriors. No n'hi ha, a més a més, cap amb nivells de susceptibilitat intermitjos a les fluoroquinolones. Les soques aïllades en els anys 1996, 1997, 1998 i 2000 són majoritàriament resistents a l'àcid nalidíxic i sensibles a les fluoroquinolones, mentre que les de l'any 1999 són majoritàriament sensibles a l'àcid nalidíxic i gairebé totes sensibles a les fluoroquinolones. Quan s'analitzen les soques d'origen animal resistents a l'àcid nalidíxic (Taula 4.8) ja no s'observa tanta diferència en els percentatges de resistents a les tres fluoroquinolones entre les soques aïllades l'any 1994 i la resta, encara que aquestes segueixen sent les que presenten els percentatges més alts.

Taula 4.5. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons la seva procedència i la susceptibilitat a les quinolones.

Animal	No. de soques (%)	Àcid Nalidíxic			Norfloxacina			Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Au	46 (38,98)	35 (76,09)	4 (8,69)	7 (15,22)	17 (36,96)	4 (8,69)	25 (54,35)	17 (36,96)	5 (10,87)	24 (52,17)	16 (34,78)	5 (10,87)	25 (54,35)
Boví	25 (21,19)	13 (52,00)	6 (24,00)	6 (24,00)	8 (32,00)	0 (0,00)	17 (68,00)	8 (32,00)	0 (0,00)	17 (68,00)	8 (32,00)	0 (0,00)	17 (68,00)
Conill	22 (18,64)	13 (59,09)	2 (9,09)	7 (31,82)	2 (9,09)	0 (0,00)	20 (90,91)	2 (9,09)	1 (4,55)	19 (86,36)	1 (4,55)	3 (13,64)	18 (81,82)
Porc	25 (21,19)	23 (92,00)	1 (4,00)	1 (4,00)	10 (40,00)	3 (12,00)	12 (48,00)	7 (28,00)	7 (28,00)	11 (44,00)	9 (36,00)	3 (12,00)	13 (52,00)

Taula 4.6. Distribució de les soques d'*E. coli* NaI^R d'origen animal segons la seva procedència i la susceptibilitat a les fluoroquinolones.

Animal	No. de soques (%)	Norfloxacina			Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S
Au	35 (41,67)	17 (48,57)	4 (11,43)	14 (40,00)	16 (45,71)	5 (14,29)	14 (40,00)	16 (45,71)	5 (14,29)	14 (40,00)
Boví	13 (15,48)	8 (61,54)	0 (0,00)	5 (38,46)	8 (61,54)	0 (0,00)	5 (38,46)	8 (61,54)	0 (0,00)	5 (38,46)
Conill	13 (15,48)	2 (15,38)	0 (0,00)	11 (84,62)	2 (15,38)	1 (7,69)	10 (76,92)	1 (7,69)	3 (23,08)	9 (69,23)
Porc	23 (27,38)	10 (43,48)	3 (13,04)	10 (43,48)	7 (30,43)	7 (30,43)	9 (39,13)	9 (39,13)	3 (13,04)	11 (47,83)

Taula 4.7. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons l'any d'aïllament i la susceptibilitat a les quinolones.

Any aïllament	No. de soques (%)	Àcid Nalidíxic			Norfloxacina			Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
1994	7 (5,93)	7 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)
1996	21 (17,80)	15 (71,43)	1 (4,76)	5 (23,81)	7 (33,33)	0 (0,00)	14 (66,67)	7 (33,33)	2 (9,52)	12 (57,14)	7 (33,33)	1 (4,76)	13 (61,91)
1997	52 (44,07)	41 (78,84)	2 (3,85)	9 (17,31)	18 (34,62)	3 (5,77)	31 (59,61)	14 (26,92)	7 (13,46)	31 (59,61)	15 (28,85)	5 (9,61)	32 (61,54)
1998	16 (13,56)	11 (68,75)	5 (31,25)	0 (0,00)	4 (25,00)	4 (25,00)	8 (50,00)	4 (25,00)	3 (18,75)	9 (56,25)	4 (25,00)	4 (25,00)	8 (50,00)
1999	11 (9,32)	2 (18,18)	2 (18,18)	7 (63,64)	1 (9,09)	0 (0,00)	10 (90,91)	2 (18,18)	0 (0,00)	9 (81,82)	1 (9,09)	0 (0,00)	10 (90,91)
2000	11 (9,32)	8 (72,73)	3 (27,27)	0 (0,00)	3 (27,27)	0 (0,00)	8 (72,73)	3 (27,27)	1 (9,09)	7 (63,64)	3 (27,27)	1 (9,09)	7 (63,64)

Taula 4.8. Distribució de les soques d'*E. coli* NaI^R d'origen animal segons l'any d'aïllament i la susceptibilitat a les fluoroquinolones.

Any aïllament	No. de soques (%)	Norfloxacina			Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S
1994	7 (8,33)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)	4 (57,14)	0 (0,00)	3 (42,86)
1996	15 (17,86)	7 (46,67)	0 (0,00)	8 (53,33)	7 (46,67)	2 (13,33)	6 (40,00)	7 (46,67)	1 (6,67)	7 (46,67)
1997	41 (48,81)	18 (43,90)	3 (7,32)	20 (48,78)	14 (34,15)	7 (17,07)	20 (48,78)	15 (36,58)	5 (12,20)	21 (51,22)
1998	11 (13,09)	4 (36,36)	4 (36,36)	3 (27,27)	4 (36,36)	3 (27,27)	4 (36,36)	4 (36,36)	4 (36,36)	3 (27,27)
1999	2 (2,38)	1 (50,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	1 (50,00)	1 (50,00)	0 (0,00)	1 (50,00)
2000	8 (9,52)	3 (37,50)	0 (0,00)	5 (62,50)	3 (37,50)	1 (12,50)	4 (50,00)	3 (37,50)	1 (12,50)	4 (50,00)

Pel que fa a aquest mateix anàlisi amb les soques aïllades d'humans, s'ha de senyalar que, degut a que més d'un 80% de les soques van ser aïllades d'orina i gairebé un 72% són l'any 2000, no es pot estudiar la distribució d'aquestes soques segons el tipus de mostra o l'any d'aïllament. Aquest anàlisi s'ha fet només, doncs, tenint en compte la procedència de les mostres i la susceptibilitat a quinolones (Taula 4.9). S'ha de destacar que el percentatge de soques de procedència intrahospitalària resistents a les fluoroquinolones és superior al de les soques de procedència extrahospitalària, però els percentatges més alts d'aïllats resistents a les fluoroquinolones corresponen a soques de procedència no determinada. Caldria destacar que aquestes soques són bàsicament les aïllades en els anys 1993, 1994 i 1998, i que al voltant d'un 46% de les aïllades l'any 2000 són resistents a les fluoroquinolones.

Taula 4.9. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen humà segons la seva procedència i la susceptibilitat a les fluoroquinolones.

Procedència	No. de soques (%)	Norfloxacina			Enrofloxacina			Ciprofloxacina		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S
Intrahosp.	24 (27,27)	15 (62,50)	2 (8,33)	7 (29,17)	15 (62,50)	6 (25,00)	3 (12,50)	15 (62,50)	4 (16,67)	5 (20,83)
Extrahosp.	47 (53,41)	24 (51,06)	4 (8,51)	19 (40,43)	26 (55,32)	8 (17,02)	13 (27,66)	25 (53,19)	5 (10,64)	17 (36,17)
N.D.	17 (19,32)	13 (76,47)	1 (5,88)	3 (17,65)	14 (82,35)	2 (11,76)	1 (5,88)	13 (76,47)	1 (5,88)	3 (17,65)

(**Intrahosp.**: Intrahospitalària; **Extrahosp.**: Extrahospitalària; **N.D.**: no determinada)

4.3. DETECCIÓ DE MUTACIONS EN ELS GENS *gyrA* I *parC*

4.3.1. Seqüenciació de les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC*

Un dels objectius d'aquest treball ha estat el desenvolupament d'un mètode alternatiu als coneguts fins al moment, que permetés detectar ràpidament les principals mutacions, en els gens *gyrA* i *parC*, associades amb l'adquisició d'un fenotip de resistència a quinolones en *E. coli*. Per al desenvolupament d'aquest mètode ha sigut necessari conèixer, en primer lloc, la seqüència de les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC* d'un nombre significatiu de soques per tal de poder avaluar tant la sensibilitat com l'especificitat de la tècnica.

Per aquest motiu s'ha procedit a la seqüenciació de les regions QRDR dels gens *gyrA* i/o *parC* d'algunes de les soques estudiades.

Així, s'ha seqüenciat la regió QRDR del gen *gyrA* de 56 soques, 3 de les quals eren de col·lecció, 43 d'origen animal i 10 d'origen humà. Seguidament, s'ha analitzat la seqüència obtinguda i s'ha deduït la seqüència d'aminoàcids corresponent a la regió QRDR del gen *gyrA* de cada soca. A la taula 4.10 es mostren els residus d'aminoàcids deduïts per als codons 83 i 87 de la proteïna GyrA. Pel que fa a les mutacions en aquestes posicions, les majoritàries són les transicions CG → TA i AT → GC en els codons 83 i 87, respectivament, que donen lloc als canvis Ser83 → Leu i Asp87 → Gly.

En aquesta taula s'indiquen també els residus de la proteïna corresponents als codons 84, 85 i 91, donat que s'han trobat determinats canvis en la seqüència de DNA d'algunes soques respecte a la seqüència salvatge. En general, la majoria de les mutacions detectades en aquestes posicions són silencioses, excepte la transversió GC → TA que dona lloc al canvi Ala84 → Ser. És de destacar també que la majoria de les soques seqüenciades presenten una mutació silenciosa en el codó 85, que, a més a

més, 21 d'elles presenten una mutació silenciosa en el codó 91 i que 3 d'aquestes presenten també una altra mutació en el codó 84.

Taula 4.10. Variabilitat en la seqüència de DNA de la regió QRDR del gen *gyrA* de les soques d'*E. coli* seqüenciades.

Aminoàcid (Codó)	No. de soques
Posició 83	
Ser83 (TCG)	18
Leu83 (TTG)	37
Ala83 (GCG)	1
Posició 87	
Asp87 (GAC)	31
Asp87 (GAT)*	3
Gly87 (GGC)	10
Gly87 (GGT)	2
Asn87 (AAC)	7
Tyr87 (TAC)	2
Ala87 (GCC)	1
Posició 84	
Ala84 (GCG)	53
Ala84 (GCA)*	1
Ser84 (TCG)	2
Posició 85	
Val85 (GTC)	11
Val85 (GTT)*	45
Posició 91	
Arg91 (CGC)	32
Arg91 (CGT)*	12
Arg91 (CGG)*	12

* mutació silenciosa

Per altra banda, a la taula 4.11 es mostra la distribució de les mutacions en el codons 83 i 87 segons la seqüència de la regió QRDR del gen *gyrA* de les soques d'*E. coli* seqüenciades. Es pot observar que 12 soques no presenten mutació en cap de les dues posicions, 22 només contenen una mutació en la Ser83, 6 en l'Asp87 i 16 soques són dobles mutants en aquests codons.

Taula 4.11. Distribució de les mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* en les soques d'*E. coli* seqüenciades.

Genotip	Aminoàcid		No. de soques
	83	87	
Salvatge	Ser	Asp	12
Mutant codó 83	Leu	Asp	21
	Ala	Asp	1
Mutant codó 87	Ser	Gly	5
	Ser	Tyr	1
Doble mutant codons 83 i 87	Leu	Gly	7
	Leu	Asn	7
	Leu	Tyr	1
	Leu	Ala	1

Igualment, s'ha seqüenciat la regió QRDR del gen *parC* de 32 soques, 25 de les quals eren d'origen animal i 7 d'origen humà. A continuació, s'ha analitzat la seqüència obtinguda i s'ha deduït la seqüència d'aminoàcids corresponent a la regió QRDR del gen *parC* de cada soca. A la taula 4.12 es mostren els residus d'aminoàcids deduïts per als codons 80 i 84 de la proteïna ParC. Pel que fa a la posició 80, s'ha trobat que 18 soques presenten el residu Ser80, que correspon al de la proteïna salvatge. No obstant, en 13 d'elles el codó que codifica aquest residu és AGC i en 5 és AGT. Pel que fa a les mutacions en aquesta posició, la majoritària és la transversió GC → TA que dona lloc al canvi Ser80 → Ile. S'ha de destacar

que s'ha trobat, només en dues soques, una única mutació Glu84 → Lys, deguda a una transició GC → AT. S'ha detectat també, en una soca, una mutació silenciosa en el codó 78.

Taula 4.12. Variabilitat en la seqüència de DNA de la regió QRDR del gen *parC* de les soques d'*E. coli* seqüenciades.

Aminoàcid (Codó)	No. de soques
Posició 80	
Ser80 (AGC)	13
Ser80 (AGT)	5
Ile80 (ATC)	7
Ile80 (ATT)	2
Arg80 (AGA)	4
Arg80 (AGG)	1
Posició 84	
Glu84 (GAA)	30
Lys84 (AAA)	2
Posició 78	
Gly78 (GGC)	31
Gly78 (GGT)*	1

* mutació silenciosa

De la mateixa manera que pel gen *gyrA*, a la taula 4.13 es mostra la distribució de les mutacions en els codons 80 i 84 segons la seqüència de la regió QRDR del gen *parC* de les soques d'*E. coli* seqüenciades. Es pot observar que 16 soques no presenten mutació en cap de les dues posicions, 14 només contenen una mutació en la Ser80 i 2 en el Glu84. S'ha de destacar que no s'han trobat dobles mutants en el gen *parC*.

Taula 4.13. Distribució de les mutacions en els codons 80 i 84 del gen *parC* en les soques d'*E. coli* seqüenciades.

Genotip	Aminoàcid		No. de soques
	80	84	
Salvatge	Ser (AGC)	Glu	11
	Ser (AGT)	Glu	5
Mutant codó 80	Ile	Glu	9
	Arg	Glu	5
Mutant codó 84	Ser (AGC)	Lys	2

D'entre totes les soques seqüenciades, n'hi ha 20 d'origen animal i 4 d'origen humà de les que s'han seqüenciat les regions QRDR, tant del gen *gyrA* com del gen *parC*. A la taula 4.14 es mostra la distribució de les mutacions en els codons 83 i 87 i en els codons 80 i 84 segons la seqüència de les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC*, respectivament, de les soques d'*E. coli* seqüenciades. S'observa que 4 soques no presenten mutació en cap dels dos gens i que tota la resta són mutants en el codó 83 del gen *gyrA*, a excepció de tres soques que contenen únicament una mutació en el codó 87 d'aquest gen. D'entre els mutants en el codó 83, només 4 soques són mutants simples i la resta presenten, a més a més, una o dues mutacions addicionals. D'entre aquestes, només una és un doble mutant en el gen *gyrA*, 6 són dobles mutants *gyrA/parC* i les altres 6 presenten una doble mutació en el gen *gyrA* acompanyada d'una mutació en el gen *parC*.

Taula 4.14. Distribució de les mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* i en els codons 80 i 84 del gen *parC*, en les soques d'*E. coli* seqüenciades.

Genotip	GyrA		ParC		No. de soques
	83	87	80	84	
Salvatge	Ser	Asp	Ser (AGC)	Glu	4
Mutant codó 83 (<i>gyrA</i>)	Leu	Asp	Ser (AGT)	Glu	3
	Leu	Asp	Ser (AGC)	Glu	1
Mutant codó 87 (<i>gyrA</i>)	Ser	Gly	Ser (AGC)	Glu	3
Doble mutant codons 83 i 87 (<i>gyrA</i>)	Leu	Asn	Ser (AGT)	Glu	1
Doble mutant codó 83 (<i>gyrA</i>) i codó 80 (<i>parC</i>)	Leu	Asp	Arg	Glu	4
	Leu	Asp	Ile	Glu	2
Triple mutant codons 83 i 87 (<i>gyrA</i>) i codó 80 (<i>parC</i>)	Leu	Asn	Ile	Glu	2
	Leu	Tyr	Ile	Glu	1
	Leu	Gly	Arg	Glu	1
Triple mutant codons 83 i 87 (<i>gyrA</i>) i codó 84 (<i>parC</i>)	Leu	Gly	Ser (AGC)	Lys	2

4.3.2. Desenvolupament i optimització del mètode d'hibridació de colònies amb sondes específiques

Un cop conegudes les seqüències que interessaven dels gens *gyrA* i *parC*, s'han dissenyat diferents sondes, descrites a l'apartat de Materials i Mètodes, per a detectar mutacions en les posicions 83 i 87 del gen *gyrA* i en els codons 80 i 84 del gen *parC*. Pel que fa a la posició 83 del gen *gyrA* s'han dissenyat dues sondes, una que conté la seqüència salvatge i l'altra el canvi Ser83 → Leu, ja que de les 56 soques seqüenciades només una presenta un canvi diferent (Ser83 → Ala). Pel que fa a la posició 87 del gen

gyrA i a les posicions 80 i 84 del gen *parC* s'ha dissenyat, en cada cas, només una sonda que conté la seqüència salvatge. Per a la posició 80 del gen *parC*, degut a que la seqüència salvatge, Ser80, pot estar codificada per dos codons diferents, AGC o AGT, s'han dissenyat dues sondes que contenen les seqüències salvatges, una per a cada possibilitat.

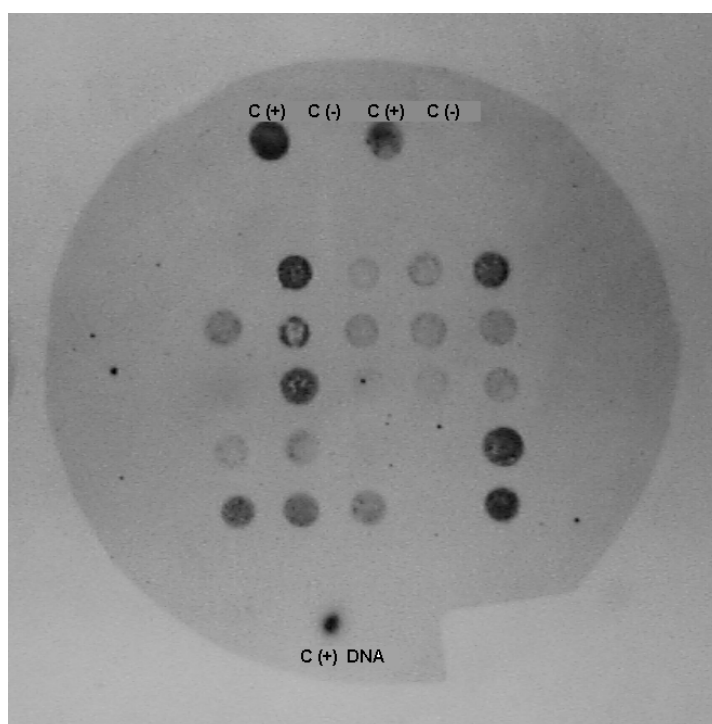


Figura 4.5. Autoradiografia d'una hibridació de la sonda E.ParCSer80, marcada amb ^{33}P , amb diferents colònies d'*E. coli*.

Un cop dissenyades les diferents sondes, s'ha procedit a la hibridació de les colònies de les soques de seqüència coneguda amb les diferents sondes, per tal de determinar la **sensibilitat** i l'**especificitat** de cada sonda. Aquests experiments han servit també per a determinar les millors condicions d'hibridació per a cada una de les sondes. Així, la temperatura a la que s'ha realitzat la hibridació amb cadascuna de les sondes ha estat la

següent: E.coliSer83, 56°C; E. coliLeu83, 54°C; E.coliAsp87, 50°C; E.ParCSer80, 50°C; E.ParCSer80(T), 56°C; i E.ParCGlu84, 59°C. A la figura 4.5 es mostra, com a exemple, el resultat d'una hibridació. A la part superior del filtre es pot observar el senyal generat per la hibridació de la sonda amb les colònies utilitzades com a controls positius i l'absència de senyal deguda a la hibridació negativa de la sonda amb les colònies utilitzades com a controls negatius, mentre que a la part inferior de filtre es pot observar el senyal generat per la hibridació amb DNA complementari al de la sonda. En aquesta imatge s'observa també com la hibridació de la sonda amb colònies de diferents soques pot generar senyals de diferent intensitat.

S'entén per **sensibilitat** el percentatge de soques que han hibridat amb la sonda respecte al total de soques que haurien d'hibridar i per **especificitat** el percentatge de soques que no han hibridat amb la sonda, en relació a les que no haurien d'hibridar. Tant la sensibilitat com l'especificitat de totes les sondes utilitzades per hibridar les colònies de les soques d'*E. coli* es mostren a la taula 4.15.

La sonda que detecta la seqüència salvatge en la posició 83 del gen *gyrA* (E.coliSer83) presenta pràcticament un 90% de sensibilitat i un 100% d'especificitat, mentre que la que detecta el canvi Ser83 → Leu (E.coliLeu83) té un 100% de sensibilitat i gairebé un 80% d'especificitat, la qual cosa indica que a través de la hibridació de colònies d'*E. coli* amb aquestes sondes es pot determinar la presència o no del canvi Ser83 → Leu amb una elevada fiabilitat.

La sonda que detecta la seqüència salvatge en la posició 87 del gen *gyrA* (E.coliAsp87) presenta poc més d'un 77% de sensibilitat i un 68% d'especificitat. El fet que més d'un 80% de les soques presentin una mutació silenciosa en el codó 85 podria interferir amb la hibridació d'aquesta sonda, ja que ha sigut dissenyada segons la seqüència salvatge en aquesta posició. La hibridació amb totes les soques seqüenciades ha permès determinar que 17 soques que són salvatges en el codó 87 i presenten la mutació silenciosa

en el codó 85 hibriden correctament amb la sonda, mentre que només 7 soques salvatges en el codó 87 i que presenten la mutació silenciosa en el codó 85 no hibriden amb la sonda. A més a més, d'aquestes 7 soques, 3 són les que presenten també una mutació en el codó 84. A través de la hibridació de colònies d'*E. coli* amb aquesta sonda, doncs, es pot determinar la presència d'una seqüència salvatge o d'una mutació en la posició 87 del gen *gyrA*, encara que amb un grau de fiabilitat menor que en el cas anterior.

Taula 4.15. Sensibilitat i especificitat de les sondes utilitzades en el mètode d'hibridació de colònies d'*E. coli*.

Sonda	Sensibilitat (%) (positius per hibridació / total)	Especificitat (%) (negatius per hibridació / total)
E.coliSer83	88,89 (16/18)	100 (38/38)
E.coliLeu83	100 (37/37)	78,95 (15/19)
E.coliAsp87	77,42 (24/31)	68,00 (17/25)
E.ParCSer80	69,23 (9/13)	94,74 (18/19)
E.ParCSer80(T)	40,00 (2/5)	96,29 (26/27)
E.ParCGlu84	83,33 (25/30)	100 (2/2)

Les dues sondes que detecten les seqüències salvatges en la posició 80 del gen *parC* (E.ParCSer80 i E.ParCSer80(T)) presenten un grau de sensibilitat molt baix (69% i 40%, respectivament), malgrat que tan sols en una de les 32 soques seqüenciades s'ha determinat la presència d'una

mutació silenciosa, en el codó 78, que podria afectar a la hibridació. De fet, aquesta soca no hibrida amb cap de les dues sondes, tot i presentar una seqüència salvatge en la posició 80. En canvi, l'especificitat d'aquestes sondes és molt superior al 90%, la qual cosa indica que un resultat d'hibridació positiu amb alguna d'aquestes dues sondes pot considerar-se com un resultat correcte amb una elevada fiabilitat. Pel contrari, degut a la baixa sensibilitat, un resultat d'hibridació negatiu amb alguna d'aquestes dues sondes no pot considerar-se com un resultat del tot fiable. De totes maneres, la combinació dels resultats obtinguts a partir de la hibridació de colònies d'*E. coli* amb les dues sondes pot servir, en certa manera, per a determinar la presència o absència de mutacions en la posició 80 del gen *parC*; és a dir, el resultat negatiu de la hibridació d'una soca determinada amb les dues sondes que detecten les seqüències salvatges en la posició 80 del gen *parC* indicarà que aquesta soca presenta, amb una certa probabilitat, una mutació en aquesta posició.

La sonda que detecta la seqüència salvatge en la posició 84 del gen *parC* (E.ParCGlu84) presenta més d'un 83% de sensibilitat i un 100% d'especificitat; per tant, i encara que només s'han obtingut dues soques que presenten una mutació en aquesta posició, mitjançant la hibridació de colònies d'*E. coli* amb aquesta sonda es pot determinar la presència d'una seqüència salvatge o d'una mutació en la posició 84 del gen *parC* amb un alt grau de fiabilitat.

4.3.3. Mutacions en les regions QRDR dels gens *gyrA* i *parC*

Un cop determinada la millor temperatura d'hibridació per a cada sonda i coneguts els graus de sensibilitat i d'especificitat de cadascuna, s'ha procedit a la hibridació de les colònies de les soques d'*E. coli* d'origen animal i humà amb totes les sondes. Posteriorment, s'han analitzat els resultats obtinguts en els experiments d'hibridació, tenint en compte la sensibilitat i l'especificitat de cada sonda, la susceptibilitat de les soques a les diferents quinolones i els dendogrames obtinguts. Aquest anàlisi preliminar ha

comportat que, en aquells casos en que no hi havia una concordància clara entre els resultats d'hibridació i els altres paràmetres, es determinés de nou tant la susceptibilitat a les quinolones, com les CB, i es confirmés per seqüenciació la presència o absència dels canvis detectats per hibridació. Tots aquests anàlisis posteriors s'han realitzat bàsicament com a conseqüència dels resultats d'hibridació d'algunes soques amb les sondes que detecten les seqüències salvatges en les posicions 87 del gen *gyrA* i 80 del gen *parC*.

Finalment, s'han analitzat totes les dades sobre la presència de mutacions, obtingudes per hibridació i per seqüenciació, i s'ha procedit a la classificació de les soques d'*E. coli* en vuit grups, segons les mutacions que presenten. Així, a la taula 4.16 es mostra aquesta classificació per a les soques d'origen animal, mentre que a la taula 4.17 es mostren els resultats per a les soques d'*E. coli* resistents a l'àcid nalidíxic tant d'origen animal com humà.

Si s'analitzen els resultats obtinguts amb les soques d'*E. coli* d'origen animal (Taula 4.16), s'observa que el més destacable és que un 26,27% no presenten mutacions ni en el gen *gyrA* ni en el gen *parC* i que un 28,81% són únicament mutants en el codó 83 del gen *gyrA*; un 17% presenten tres mutacions i la resta són dobles mutants o presenten una única mutació en el codó 87 del gen *gyrA*. Si s'analitzen només les soques resistents a l'àcid nalidíxic (Taula 4.17) s'observa que, a excepció d'un 8%, totes presenten un canvi en el codó 83 del gen *gyrA*, tractant-se tant de dobles (>27%) com de triples mutants (24%) en les diferents posicions analitzades o bé com a única mutació (>40%).

De la mateixa manera, totes les soques d'origen humà (Taula 4.17), a excepció d'una que no conté cap mutació, presenten una mutació en el codó 83 del gen *gyrA*, la qual va acompanyada, en més del 51% de les soques, de dues mutacions, una en el codó 87 del mateix gen i l'altra en els codons 80 o 84 del gen *parC*. S'ha de destacar també que, en més d'un 35% de les

RESULTATS

soques, aquest canvi en el codó 83 del gen *gyrA* no va acompanyat de cap altra mutació.

Taula 4.16. Classificació de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons les mutacions que presenten.

Grup	Mutant	No. de soques	%
I	-	31	26,27
II	83 (<i>gyrA</i>)	34	28,81
III	87 (<i>gyrA</i>)	10	8,47
IV	83 i 87 (<i>gyrA</i>)	9	7,63
V	83 (<i>gyrA</i>) i 80 (<i>parC</i>)	14	11,86
VII	83 i 87 (<i>gyrA</i>) i 80 (<i>parC</i>) o 84 (<i>parC</i>)	20 (15) (5)	16,95 (12,71) (4,24)

Taula 4.17. Classificació de les soques d'*E. coli* NaI^R segons el seu origen i les mutacions que presenten.

Grup	Mutant	ORIGEN ANIMAL		ORIGEN HUMÀ	
		No. de soques	%	No. de soques	%
I	-	0	0,00	1	1,14
II	83 (<i>gyrA</i>)	34	40,48	31	35,23
III	87 (<i>gyrA</i>)	7	8,33	0	0,00
IV	83 i 87 (<i>gyrA</i>)	9	10,71	1	1,14
V	83 (<i>gyrA</i>) i 80 (<i>parC</i>)	14	16,67	3	3,41
VI	83 (<i>gyrA</i>) i 80 i 84 (<i>parC</i>)	0	0,00	1	1,14
VII	83 i 87 (<i>gyrA</i>) i 80 (<i>parC</i>) o 84 (<i>parC</i>)	20 (15) (5)	23,81 (17,86) (5,95)	45 (32) (13)	51,13 (36,36) (14,77)
VIII	83 i 87 (<i>gyrA</i>) i 80 i 84 (<i>parC</i>)	0	0,00	6	6,82

Un cop classificades les soques d'*E. coli*, tant d'origen animal com humà, en aquests vuit grups de mutacions, s'ha procedit a estudiar com es distribueixen segons la seva procedència i l'any en el que van ser aïllades.

Així, a la taula 4.18 es mostra aquesta distribució per a les soques d'*E. coli* d'origen animal, i a la taula 4.19 per a les soques resistents a l'àcid nalidíxic del mateix origen. A l'analitzar el conjunt de soques d'origen animal s'observa que un 37% de les aïllades d'au presenten una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II), un 24% no contenen cap canvi (Grup I) i un altre 24% posseeixen tres mutacions (Grup VII), mentre que un 44% de les aïllades de boví no presenten cap mutació (Grup I) i la resta es reparteixen pels altres grups. D'entre els aïllats de conill, un 32% no presenten tampoc cap mutació (Grup I), un 23% contenen una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II) i més d'un 27% són únicament mutants en el codó 87 del mateix gen (Grup III). El 36% de les soques aïllades de porc presenten un canvi en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II), un altre 36% són dobles mutants (Grups IV i V) i un 20% contenen tres mutacions (Grup VII). Considerant tot això, és destacable que entre les soques aïllades d'au no es troben pràcticament dobles mutants, mentre que entre les aïllades de boví es poden trobar, aproximadament amb les mateixes proporcions, les diferents combinacions de mutacions descrites. Per altra banda, les soques aïllades de conill no presenten cap mutació o bé són mutants simples en el gen *gyrA*, i les aïllades de porc presenten majoritàriament una mutació en el codó 83 del gen *gyrA*, acompanyada o no d'altres mutacions.

En canvi, si es tenen en compte només les soques resistents a l'àcid nalidíxic i l'animal del que s'han aïllat, s'ha de destacar que més d'un 48% de les procedents d'au presenten una única mutació en el codó 83 el gen *gyrA* (Grup II) i més d'un 31% contenen tres mutacions (Grup VII). Un 69% de les procedents de conill presenten una única mutació en el gen *gyrA* (Grups II i III) i un 39% de les de porc presenten també una única mutació en el codó 83 el gen *gyrA* (Grup II), mentre que més d'un 30% són dobles mutants en el codó 83 el gen *gyrA* i en el 80 del gen *parC* (Grup V). Les procedents de boví queden repartides per tots els grups.

Taula 4.18. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons la seva procedència, l'any d'aïllament i les mutacions que presenten.

Grup	Animal	Any d'aïllament						Subtotal (%) [*]	TOTAL (%)
		1994	1996	1997	1998	1999	2000		
I	Au	0	0	0	0	8	3	11 (23,91)	31 (26,27)
	Boví	0	2	5	4	0	0	11 (44,00)	
	Conill	0	3	3	1	0	0	7 (31,82)	
	Porc	0	0	1	0	1	0	2 (8,00)	
II	Au	3	3	2	6	1	2	17 (36,96)	34 (28,81)
	Boví	0	1	1	1	0	0	3 (12,00)	
	Conill	0	0	5	0	0	0	5 (22,73)	
	Porc	0	0	8	0	0	1	9 (36,00)	
III	Au	0	1	0	0	0	0	1 (2,17)	10 (8,47)
	Boví	0	1	2	0	0	0	3 (12,00)	
	Conill	0	2	2	0	0	2	6 (27,27)	
	Porc	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
IV	Au	0	2	0	1	0	1	4 (8,70)	9 (7,63)
	Boví	0	0	1	0	0	0	1 (4,00)	
	Conill	0	0	2	0	0	0	2 (9,09)	
	Porc	0	0	2	0	0	0	2 (8,00)	
V	Au	0	0	1	0	0	1	2 (4,35)	14 (11,86)
	Boví	0	1	3	0	0	0	4 (16,00)	
	Conill	0	1	0	0	0	0	1 (4,55)	
	Porc	0	0	7	0	0	0	7 (28,00)	
VII	Au	4	3	0	2	1	1	11 (23,91)	20 (16,95)
	Boví	0	1	1	1	0	0	3 (12,00)	
	Conill	0	0	1	0	0	0	1 (4,55)	
	Porc	0	0	5	0	0	0	5 (20,00)	
								118	

* Percentatge respecte al total de soques aïllades de cada tipus d'animal.

No. total de soques → **Au:** 46; **Boví:** 25; **Conill:** 22; **Porc:** 25.

Taula 4.19. Distribució de les soques d'*E. coli* Nal^R d'origen animal segons la seva procedència, l'any d'aïllament i les mutacions que presenten.

Grup	Animal	Any d'aïllament						Subtotal (%) [*]	TOTAL (%)
		1994	1996	1997	1998	1999	2000		
II	Au	3	3	2	6	1	2	17 (48,57)	34 (40,48)
	Boví	0	1	1	1	0	0	3 (23,08)	
	Conill	0	0	5	0	0	0	5 (38,46)	
	Porc	0	0	8	0	0	1	9 (39,13)	
III	Au	0	1	0	0	0	0	1 (2,86)	7 (8,33)
	Boví	0	1	1	0	0	0	2 (15,38)	
	Conill	0	1	1	0	0	2	4 (30,77)	
	Porc	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
IV	Au	0	2	0	1	0	1	4 (11,43)	9 (10,71)
	Boví	0	0	1	0	0	0	1 (7,69)	
	Conill	0	0	2	0	0	0	2 (15,38)	
	Porc	0	0	2	0	0	0	2 (8,70)	
V	Au	0	0	1	0	0	1	2 (5,71)	14 (16,67)
	Boví	0	1	3	0	0	0	4 (30,77)	
	Conill	0	1	0	0	0	0	1 (7,69)	
	Porc	0	0	7	0	0	0	7 (30,43)	
VII	Au	4	3	0	2	1	1	11 (31,43)	20 (23,81)
	Boví	0	1	1	1	0	0	3 (23,08)	
	Conill	0	0	1	0	0	0	1 (7,69)	
	Porc	0	0	5	0	0	0	5 (21,74)	
								84	

* Percentatge respecte al total de soques Nal^R aïllades de cada tipus d'animal.

No. total de soques → **Au:** 35; **Boví:** 13; **Conill:** 13; **Porc:** 23.

Taula 4.20. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen humà segons la seva procedència, l'any d'aïllament i les mutacions que presenten.

Grup	Procedència	Any d'aïllament					Subtotal (%) [*]	TOTAL (%)
		1993	1994	1998	1999	2000		
I	Intrahosp.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	1 (1,14)
	Extrahosp.	0	0	0	0	1	1 (2,13)	
	N.D.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
II	Intrahosp.	0	0	0	0	8	8 (33,33)	31 (35,23)
	Extrahosp.	0	0	0	0	20	20 (42,55)	
	N.D.	0	0	0	0	3	3 (17,65)	
IV	Intrahosp.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	1 (1,14)
	Extrahosp.	0	0	0	0	1	1 (2,13)	
	N.D.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
V	Intrahosp.	0	0	0	0	1	1 (4,17)	3 (3,41)
	Extrahosp.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	N.D.	0	2	0	0	0	2 (11,76)	
VI	Intrahosp.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	1 (1,14)
	Extrahosp.	0	0	0	0	1	1 (2,13)	
	N.D.	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
VII	Intrahosp.	0	0	0	5	9	14 (58,33)	45 (51,13)
	Extrahosp.	0	0	0	6	14	20 (42,55)	
	N.D.	2	2	7	0	0	11 (64,71)	
VIII	Intrahosp.	0	0	0	0	1	1 (4,17)	6 (6,82)
	Extrahosp.	0	0	0	0	4	4 (8,51)	
	N.D.	0	0	1	0	0	1 (5,88)	
							88	

* Percentatge respecte al total de soques aïllades de mostres de cada procedència.

No. total de soques → **Intrahosp.:** 24; **Extrahosp.:** 47; **N.D.:** 17.

(**Intrahosp.:** Intrahospitalària; **Extrahosp.:** Extrahospitalària; **N.D.:** no determinada)

El mateix anàlisi s'ha fet amb les soques aïllades d'humans i els resultats obtinguts es mostren a la taula 4.20. En aquesta taula s'aprecia que més d'un 58% de les soques de procedència intrahospitalària presenten tres mutacions (Grup VII) i més d'un 33% presenten una única mutació en el codó 83 el gen *gyrA* (Grup II). D'entre les de procedència extrahospitalària, un 42,5% presenten tres mutacions (Grup VII) i un altre 42,5% contenen només un canvi en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II), mentre que pràcticament un 65% de les de procedència no determinada presenten tres mutacions (Grup VII).

4.4. RELACIÓ ENTRE LA PRESENCIA DE MUTACIONS I LA SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES

Quan s'ha estudiat la possible relació existent entre la presència de mutacions i la susceptibilitat a les diferents quinolones, s'ha vist que totes les soques que s'inclouen dins d'un mateix grup mutacional no són iguals entre elles quan es té en compte la seva susceptibilitat a aquests antimicrobians. Utilitzant els valors de CMI_s per a les quatre quinolones, s'han distingit diferents subgrups per a cada grup mutacional. A les taules 4.21 i 4.22 es mostren els resultats d'aquest anàlisi per a les soques d'*E. coli* d'origen animal i humà, respectivament.

És de destacar que les soques d'origen animal en les que no s'ha detectat cap mutació (Grup I) són sensibles a totes les quinolones o bé presenten un nivell de susceptibilitat intermig a l'àcid nalidíxic (Taula 4.21). Malgrat això, aquest grup inclou la soca A-033, aïllada d'au l'any 1999, que és sensible a totes les quinolones, inclòs l'àcid nalidíxic, menys a l'enrofloxacina, front a la qual presenta una CMI superior a 38,67 µg/ml. Pel que fa als aïllats que contenen una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II), s'observa que bàsicament són resistents a l'àcid nalidíxic i sensibles a les fluoroquinolones, encara que alguns d'ells presenten un nivell de susceptibilitat intermig a una, a dues o a les tres fluoroquinolones.

Taula 4.21. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen animal segons les mutacions que presenten i la susceptibilitat a les diferents quinolones.

Grup	Subgrup	No. de soques	CMI (µg/ml)			
			NAL	NOR	ENR	CIP
I	I1	15	2,16-7,55	0,06-0,27	0,02-0,82	0,01-0,07
	I2	3	10,30-12,97	0,08-0,25	0,05-0,98	0,04-0,07
	I3	1	5,69	0,11	≥ 38,67	0,05
	I4	12	17,94-33,32	0,08-1,78	0,09-1,08	0,10-0,58
II	II1	2	38,50-177,23	0,27-1,20	0,50-0,52	0,20-0,31
	II2	14	≥ 342,64	0,13-2,33	0,10-1,14	0,03-0,5
	II3	10	≥ 342,64	0,51-6,31	0,39-1,23	0,60-1,27
	II4	8	≥ 342,64	3,36-16,00	1,29-3,99	1,01-3,35
III	III1	2	2,43-11,45	0,04-0,06	0,04-0,05	0,02-0,07
	III2	1	21,70	0,35	0,21	0,08
	III3	7	69,38-≥342,64	0,27-3,29	0,04-0,92	0,06-1,11
IV	IV1	1	≥ 342,64	6,31	1,63	1,54
	IV3	2	≥ 342,64	26,50-≥57,35	15,68-≥38,67	10,81-16,35
	IV4	6	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
V	V1	3	≥ 342,64	3,36-8,66	2,18-5,15	0,68-1,41
	V2	2	≥ 342,64	≥ 57,35	3,88-5,15	3,95-16,50
	V3	5	≥ 342,64	≥ 57,35	9,19-≥38,67	4,89-14,47
	V4	4	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
VII	VII1	4	≥ 342,64	4,61-22,28	1,15-5,15	1,32-17,63
	VII2	10	≥ 342,64	≥ 57,35	16,33-≥38,67 (1 soca)	4,41-24,96
	VII3	6	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08

NAL: Àcid Nalidíxic; NOR: Norfloxacina; ENR: Enrofloxacina; CIP: Ciprofloxacina

Les soques en les que s'ha detectat una única mutació en el codó 87 del gen *gyrA* (Grup III) són també majoritàriament resistents a l'àcid nalidíxic i sensibles a les fluoroquinolones. Dins aquest grup, però, s'inclouen també algunes soques sensibles o amb un nivell de susceptibilitat intermig a l'àcid

nalidíxic i molt sensibles a les fluoroquinolones. Els aïllats que presenten dues mutacions en el gen *gyrA* (Grup IV) són gairebé tots resistents a l'àcid nalidíxic i a les fluoroquinolones, al igual que els dobles mutants GyrA83/ParC80 (Grup V) i els triples mutants GyrA83/GyrA87/ParC80 o ParC84 (Grup VII). Caldria destacar, però, que algunes de les soques d'aquests grups són sensibles o bé presenten uns nivells de susceptibilitat intermitjos a alguna de les fluoroquinolones.

Pel que fa a aquesta mateixa distribució però amb les soques d'origen humà (Taula 4.22), és de destacar que només s'ha trobat una soca sense cap de les mutacions estudiades (Grup I), però que és resistent a l'àcid nalidíxic i sensible a la resta de quinolones. Les soques amb una única mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (Grup II) tenen unes característiques similars a les indicades per a les soques d'origen animal. Malgrat això, s'ha de destacar la inclusió d'una soca resistent a l'àcid nalidíxic i a l'enrofloxacin, però sensible a les altres dues fluoroquinolones (Subgrup II5). És de ressaltar també que només s'ha trobat un doble mutant en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* (Grup IV) el qual és resistent a l'àcid nalidíxic i a les fluoroquinolones, menys a la norfloxacin, front a la qual presenta un nivell de susceptibilitat intermig. Per altra banda, els dobles mutants *gyrA/parC* (Grup V) i els triples mutants (Grup VII) presenten també unes característiques similars a les indicades per a les soques d'origen animal, si bé les del Grup VII són totes resistents a l'àcid nalidíxic i a les tres fluoroquinolones. Així mateix, les soques en les que s'han detectat quatre mutacions (Grup VIII) són resistents a l'àcid nalidíxic i, la majoria, molt resistents a les fluoroquinolones. Finalment, assenyalar que només s'ha detectat una soca amb una mutació en el codó 83 gen *gyrA* i dues mutacions en els codons 80 i 84 del gen *parC* (Grup VI), la qual és resistent a l'àcid nalidíxic i presenta un nivell de susceptibilitat intermig a les tres fluoroquinolones.

Taula 4.22. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen humà segons les mutacions que presenten i la susceptibilitat a les diferents quinolones.

Grup	Subgrup	No. de soques	CMI (µg/ml)			
			NAL	NOR	ENR	CIP
I	I5	1	131,48	1,38	0,92	0,52
II	II2	5	≥ 342,64	0,73-3,05	0,37-1,38	0,28-0,48
	II3	9	≥ 342,64	1,71-4,64	0,40-1,24	0,52-1,34
	II4	16	≥ 342,64	0,85-14,47	1,33-4,16	0,72-2,59
	II5	1	≥ 342,64	5,36	6,18	1,36
IV	IV2	1	≥ 342,64	8,39	8,00	5,06
V	V2	1	≥ 342,64	14,93	4,13	3,79
	V3	2	≥ 342,64	16,21-≥57,35	≥ 38,67	4,24-7,53
VI	VI1	1	≥ 342,64	7,65	3,36	3,92
VII	VII2	8	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	7,61-25,44
	VII3	37	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
VIII	VIII1	1	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	12,52
	VIII2	5	≥ 342,64	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08

NAL: Àcid Nalidíxic; NOR: Norfloxacina; ENR: Enrofloxacina; CIP: Ciprofloxacina

4.5. SUSCEPTIBILITAT A ALTRES ANTIMICROBIANS

Com s'ha comentat a la Introducció d'aquesta memòria, a més de les mutacions en els enzims diana de les quinolones, és a dir, en la DNA girasa i la topoisomerasa IV, és també conegut que mutacions que alterin la permeabilitat de la membrana o els sistemes d'expulsió activa del bacteri donen lloc a un fenotip de resistència a diferents antimicrobians no relacionats estructuralment entre ells, entre els que s'inclouen les quinolones. De fet, soques amb mutacions en els gens *gyrA* i/o *parC* poden

presentar un nivell més elevat de resistència a les quinolones com a conseqüència de mutacions que modifiquin la permeabilitat de la seva membrana o els sistemes d'expulsió activa. Per aquest motiu, en aquest treball, s'ha determinat el nivell de susceptibilitat de les soques d'*E. coli* front a cinc antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones (tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina, amoxicil·lina i cefalexina) realitzant també antibiogrames mitjançant el mètode de difusió amb discs impregnats d'antibiòtics. A les taules 4.23 i 4.24 es mostren les concentracions mínimes inhibidores (CMI_s), en µg/ml, d'aquests cinc antimicrobians, obtingudes per a totes les soques d'*E. coli* d'origen animal i humà, respectivament. En aquestes taules s'han destacat també, en negreta, aquells valors de CMI que indiquen resistència a un d'aquests antimicrobians en concret.

Taula 4.23. Concentració Mínima Inhibitòria de diferents antimicrobians per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animals.

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
C-53	≥ 114,51	8,10	≥ 107,59	≥ 111,33	4,60
C-65	≥ 114,51	6,00	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70
C-66	≥ 114,51	6,03	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
C-67	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
C-69	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
C-70	≥ 114,51	280,57	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
C-71	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-32	≥ 114,51	162,83	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-33	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-34	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	16,63
EC-35	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-36	≥ 114,51	3,11	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-37	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-55	2,14	≥ 355,61	2,16	2,39	7,06
EC-56	≥ 114,51	≥ 355,61	2,16	1,43	4,60
EC-57	≥ 114,51	3,57	≥ 107,59	≥ 111,33	4,60
EC-58	≥ 114,51	3,09	1,40	3,09	10,84
EC-59	≥ 114,51	3,25	2,68	1,85	7,06
EC-60	2,97	3,56	69,70	≥ 111,33	7,06
EC-65	≥ 114,51	10,46	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-66	1,94	2,47	≥ 107,59	≥ 111,33	7,06
EC-67	≥ 114,51	8,00	1,74	1,43	7,06
EC-68	≥ 114,51	4,68	≥ 107,59	≥ 111,33	20,60
EC-69	3,70	11,50	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-70	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-71	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70

Taula 4.23. continuació

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
EC-73	≥ 114,51	4,11	3,34	2,39	10,84
EC-76	4,12	7,68	2,68	2,39	8,75
EC-4	1,99	3,03	4,40	4,78	6,96
EC-6	1,88	3,25	4,74	2,36	8,14
EC-10	2,07	3,32	4,13	2,62	7,88
EC-12	≥ 114,51	6,06	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-13	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-14	≥ 114,51	149,97	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70
EC-16	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-17	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-20	≥ 114,51	55,37	≥ 107,59	≥ 111,33	39,17
EC-21	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-22	≥ 114,51	22,57	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-23	≥ 114,51	29,74	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-24	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,30	13,43
EC-25	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-26	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-27	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-28	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-29	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-30	≥ 114,51	212,96	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-31	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-38	≥ 114,51	≥ 355,31	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-39	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	12,33
EC-40	2,07	1,74	1,74	1,85	10,84
EC-41	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-42	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-43	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	12,06
EC-44	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-46	≥ 114,51	94,49	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-47	≥ 114,51	3,57	2,68	2,39	8,75
EC-48	2,37	2,00	1,74	3,09	10,84
EC-49	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,43
EC-50	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-51	≥ 114,51	14,26	≥ 107,59	≥ 111,30	7,06
EC-52	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-53	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-54	≥ 114,51	3,46	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70
EC-61	2,16	3,90	2,68	2,39	7,06
EC-62	≥ 114,51	1,36	2,16	1,85	8,75
EC-63	≥ 114,51	2,10	3,34	3,99	4,60
EC-64	3,33	7,42	0,91	0,67	3,72
EC-78	≥ 114,51	5,14	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-80	≥ 114,51	15,32	≥ 107,59	≥ 111,33	16,63
EC-81	2,21	4,78	1,74	1,43	5,70
EC-85	≥ 114,51	7,94	3,34	1,85	8,75
EC-86	2,51	3,74	2,68	2,39	7,06
EC-88	2,13	5,48	1,74	1,43	7,06
EC-89	≥ 114,51	4,31	1,74	1,11	7,06
EC-90	≥ 114,51	24,87	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-91	2,92	6,69	3,34	2,39	13,43
EC-92	≥ 114,51	6,33	2,68	1,85	8,75
EC-93	2,30	5,05	2,16	1,43	7,06
EC-94	≥ 114,51	9,57	5,15	3,99	13,43
EC-122	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	40,97
EC-123	≥ 114,51	2,83	≥ 107,59	≥ 111,33	8,08

Taula 4.23. continuació

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
EC-133	≥ 114,51	5,83	≥ 107,59	≥ 111,33	4,60
EC-134	≥ 114,51	3,59	≥ 107,59	≥ 111,33	10,84
EC-135	≥ 114,51	5,83	≥ 107,59	≥ 111,33	4,60
EC-181	≥ 114,51	≥ 355,61	8,34	4,90	13,63
EC-185	≥ 114,51	≥ 355,61	9,17	4,91	7,47
EC-186	≥ 114,51	5,76	7,51	6,17	10,04
EC-189	≥ 114,51	≥ 355,61	9,29	4,37	11,44
EC-372	≥ 114,51	7,51	≥ 107,59	≥ 111,33	12,73
EC-375	≥ 114,51	6,75	≥ 107,59	≥ 111,33	12,65
EM-010	5,23	11,55	6,93	4,50	6,78
EM-080	4,48	19,81	8,61	5,63	14,47
EM-344	≥ 114,51	12,01	10,20	7,23	20,17
EM-353	4,26	9,66	8,63	3,42	10,84
EM-365	≥ 114,51	18,78	≥ 107,59	≥ 111,33	16,42
A-002	≥ 114,51	4,87	≥ 107,59	≥ 111,33	13,69
A-008	2,20	2,98	1,67	3,07	7,86
A-017	≥ 114,51	9,38	≥ 107,59	≥ 111,33	19,20
A-022	1,63	2,73	2,11	2,44	5,96
A-033	2,24	2,78	≥ 107,59	2,30	8,53
A-065	1,89	2,99	1,58	1,65	7,40
EC-377	2,89	4,72	1,56	1,73	6,97
EC-378	1,94	3,55	2,52	3,05	7,22
EC-379	1,56	2,43	11,50	1,58	7,16
EC-380	1,98	3,63	4,72	2,68	7,50
EC-390	≥ 114,51	7,05	5,75	1,76	10,21
AT-015	≥ 114,51	13,45	3,36	8,74	17,81
AT-030	≥ 114,51	9,45	3,10	7,31	13,23
AT-087	≥ 114,51	12,54	5,47	10,40	20,17
AT-102	≥ 114,51	6,94	2,48	3,30	9,33
AT-117	0,91	7,33	1,14	1,93	5,58
AT-195	1,60	2,26	1,23	2,07	7,00
EC-381	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,72
EC-384	≥ 114,51	8,68	≥ 107,59	≥ 111,33	10,17
EC-385	≥ 114,51	20,49	10,70	2,86	7,98
EC-499	≥ 114,51	9,94	10,84	6,46	15,77
EC-501	≥ 114,51	12,60	9,77	4,15	10,10

TET: Tetraciclina; CHL: Cloranfenicol; AMP: Ampicil·lina; AMX: Amoxicil·lina; LEX: Cefalexina.

TET R: ≥10,81

AMP R: ≥23,53

LEX R: ≥25,52

CHL R: ≥24,86

AMX R: ≥18,54

Taula 4.24. Concentració Mínima Inhibitòria de diferents antimicrobians per a les soques d'*E. coli* aïllades d'humans.

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
EC-392	4,32	17,13	≥ 107,59	≥ 111,33	17,81
EC-397	≥ 114,51	8,10	≥ 107,59	≥ 111,33	10,96
EC-398	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	13,54
EC-399	≥ 114,51	≥ 355,61	15,08	8,76	26,53
EC-400	≥ 114,51	45,41	≥ 107,59	≥ 111,33	15,43
EC-401	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-405	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	22,59
EC-406	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-407	2,88	8,35	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-408	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-409	≥ 114,51	25,11	≥ 107,59	≥ 111,33	30,95
EC-410	≥ 114,51	7,55	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-411	≥ 114,51	4,79	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-412	2,73	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-413	≥ 114,51	49,30	≥ 107,59	≥ 111,33	44,44
EC-414	7,72	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-415	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-416	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-417	2,98	7,68	≥ 107,59	≥ 111,33	30,29
EC-418	≥ 114,51	10,46	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-420	≥ 114,51	18,65	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-421	≥ 114,51	21,10	≥ 107,59	≥ 111,33	19,12
EC-422	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,64
EC-423	2,26	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-424	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	48,31
EC-425	≥ 114,51	11,03	≥ 107,59	≥ 111,33	12,01
EC-426	≥ 114,51	166,41	2,27	3,01	9,13
EC-427	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	16,49
EC-428	2,18	53,79	≥ 107,59	≥ 111,33	17,03
EC-429	2,53	9,01	≥ 107,59	≥ 111,33	11,63
EC-430	≥ 114,51	≥ 355,61	67,76	≥ 111,33	6,68
EC-431	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	14,63
EC-432	2,42	7,37	≥ 107,59	≥ 111,33	12,59
EC-433	2,76	5,47	≥ 107,59	≥ 111,33	15,43
EC-434	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,21
EC-435	3,35	7,05	≥ 107,59	≥ 111,33	8,86
EC-436	2,96	15,04	4,87	2,32	9,31
EC-437	≥ 114,51	233,46	≥ 107,59	≥ 111,33	8,75
EC-438	3,00	7,53	10,50	4,14	15,87
EC-439	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	18,75
EC-440	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	17,18
EC-441	3,39	5,66	5,74	4,89	13,75
EC-442	≥ 114,51	5,43	≥ 107,59	≥ 111,33	8,68
EC-444	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	24,19
EC-445	1,40	3,32	≥ 107,59	≥ 111,33	12,30
EC-446	70,26	11,98	≥ 107,59	≥ 111,33	9,49
EC-447	≥ 114,51	6,94	3,72	3,91	5,22
EC-448	≥ 114,51	239,76	≥ 110,59	≥ 111,33	8,37
EC-449	2,63	5,02	≥ 107,59	≥ 111,33	13,54
EC-450	≥ 114,51	9,27	8,23	4,54	7,23
EC-451	1,91	2,38	≥ 107,59	≥ 111,33	6,93

Taula 4.24. continuació

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
EC-452	89,81	6,67	6,60	6,01	8,46
EC-453	≥ 114,51	3,73	≥ 107,59	≥ 111,33	38,09
EC-454	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-455	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	27,22
EC-456	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	12,09
EC-457	≥ 114,51	277,87	≥ 107,59	≥ 111,33	6,84
EC-458	≥ 114,51	7,12	≥ 107,59	≥ 111,33	17,32
EC-459	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	11,41
EC-461	2,00	4,80	≥ 107,59	≥ 111,33	10,25
EC-462	≥ 114,51	≥ 355,61	5,62	4,80	10,27
EC-463	≥ 114,51	11,92	≥ 107,59	≥ 111,33	15,43
EC-464	≥ 114,51	15,67	≥ 107,59	≥ 111,33	13,93
EC-465	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	18,12
EC-467	≥ 114,51	≥ 355,61	6,10	4,98	7,58
EC-468	2,93	27,00	5,34	6,01	29,97
EC-469	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	14,91
EC-470	≥ 114,51	4,86	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-471	≥ 114,51	3,21	≥ 107,59	≥ 111,33	9,29
EC-472	2,08	10,02	≥ 107,59	≥ 111,33	4,56
EC-473	≥ 114,51	2,27	≥ 107,59	≥ 111,33	5,78
EC-474	≥ 114,51	9,01	5,94	1,66	6,64
EC-475	≥ 114,51	12,10	5,30	8,99	9,61
EC-476	≥ 114,51	3,59	≥ 107,59	≥ 111,33	10,36
EC-477	≥ 114,51	8,88	7,07	3,46	9,45
EC-478	2,41	12,33	5,79	7,85	9,25
EC-480	≥ 114,51	6,36	≥ 107,59	≥ 111,33	12,81
EC-481	4,23	5,91	≥ 107,59	≥ 111,33	10,43
EC-482	≥ 114,51	12,01	6,25	5,89	17,03
EC-483	≥ 114,51	9,32	≥ 107,59	≥ 111,33	13,26
EC-484	≥ 114,51	8,46	3,36	3,75	7,75
EC-485	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	32,23
EC-486	≥ 114,51	46,30	7,85	5,97	13,09
EC-487	≥ 114,51	107,16	≥ 107,59	≥ 111,33	≥ 114,25
EC-488	≥ 114,51	13,65	≥ 107,59	≥ 111,33	50,43
EC-489	4,05	8,54	8,52	5,74	11,56
EC-490	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	18,04
EC-491	≥ 114,51	8,71	≥ 107,59	≥ 111,33	13,60

TET: Tetraciclina; CHL: Cloranfenicol; AMP: Ampicil·lina; AMX: Amoxicil·lina; LEX: Cefalexina.

TET R: ≥10,81

AMP R: ≥23,53

LEX R: ≥25,52

CHL R: ≥24,86

AMX R: ≥18,54

Tenint en compte si les soques són resistents o no a aquests antimicrobians, s'han definit 13 categories en funció de l'espectre de resistència i s'han analitzat els resultats obtinguts. El primer tret més destacable d'aquest anàlisi és que un 21,19% de les soques d'origen animal

són sensibles a aquests cinc antimicrobians estudiats, mentre que entre les d'origen humà aquest percentatge és tan sols del 5,68% (dades no presentades). En canvi, quan es consideren només les soques resistents a l'àcid nalidíxic, ambdós percentatges ja no són tant diferents, doncs el percentatge de soques d'origen animal sensibles als cinc antimicrobians és, en aquest cas, del 13% (Taula 4.25). S'observa també, en aquesta taula, que la majoria de soques resistents a l'àcid nalidíxic són multiresistents a tres o a quatre d'aquests antimicrobians, sent la categoria més representada la K (resistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampil·lina i amoxicil·lina), seguida de la F (resistents a tetraciclina, ampil·lina i amoxicil·lina), tant per les soques d'origen animal com humà. S'ha de ressaltar també que més d'un 16% de les d'origen animal presenten només resistència a tetraciclina (B), mentre que més d'un 13% de les d'origen humà són resistents als cinc antimicrobians (N). S'observa també que la resistència a cefalexina es troba sobretot present entre les soques d'origen humà i associada normalment a altres resistències.

Quan en el grup de soques d'origen animal resistents a l'àcid nalidíxic s'analitza la resistència a aquests altres antimicrobians segons el tipus d'animal del qual van ser aïllades i l'any d'aïllament (Taula 4.26) s'observa que les soques procedents d'au, aïllades en anys diferents, són majoritàriament resistents a tetraciclina, ampil·lina i amoxicil·lina (F). Tant entre els aïllats de boví com de porc, s'aprecia que la majoria són, a més a més, resistents a cloranfenicol (K) i, en ambdós casos, corresponen a soques aïllades preferentment l'any 1997. En canvi, entre els aïllats de conill, la categoria predominant és la B, la qual inclou únicament resistents a tetraciclina.

Quan es fa el mateix anàlisi en el grup de soques d'origen humà (Taula 4.27) s'observa que entre les soques de procedència intrahospitalària es troben representades pràcticament totes les categories. El mateix s'aprecia entre les soques de procedència extrahospitalària, però dins aquest grup cal destacar la presència de soques resistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampil·lina i amoxicil·lina (K). Pel que fa a les soques de

procedència no determinada no s'observa tampoc cap categoria molt més representada que les altres.

Taula 4.25. Distribució de les soques d'*E. coli* Na^R segons el patró resistència a diferents antimicrobians.

Categoria	Resistència	ORIGEN ANIMAL		ORIGEN HUMÀ	
		No. de soques	%	No. de soques	%
A	- *	11	13,09	5	5,68
B	TET	14	16,67	8	9,09
C	AMP, AMX	2	2,38	11	12,50
D	TET, CHL	3	3,57	4	4,54
E	CHL, LEX	0	0,00	1	1,14
F	TET, AMP, AMX	18	21,43	14	15,91
G	AMP, AMX, LEX	0	0,00	2	2,27
H	TET, CHL, LEX	0	0,00	1	1,14
J	CHL, AMP, AMX	0	0,00	1	1,14
K	TET, CHL, AMP, AMX	32	38,09	19	21,59
L	TET, AMP, AMX, LEX	1	1,19	7	7,95
M	CHL, AMP, AMX, LEX	0	0,00	3	3,41
N	TET, CHL, AMP, AMX, LEX	3	3,57	12	13,64

(**TET**: tetraciclina, **CHL**: cloranfenicol, **AMP**: ampicil·lina, **AMX**: amoxicil·lina, **LEX**: cefalexina)

* Les soques que pertanyen a la categoria A no presenten resistència a cap dels cinc antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones.

Taula 4.26. Distribució de les soques d'*E. coli* NaI^R d'origen animal segons la seva procedència, l'any d'aïllament i el patró de resistència a diferents antimicrobians.

	1994		1996		1997		1998		1999		2000		TOTAL
	Nº	Cat.	Nº	Cat.	Nº	Cat.	N ^a	Cat.	Nº	Cat.	Nº	Cat.	
Au			1	A	1	A					2	A	
			2	B			1	B			2	B	
			2	C									
	3	F	2	F	2	F	3	D					
	4	K	2	K			5	F	2	F	1	F	
(Total)	(7)		(9)		(3)		(9)		(2)		(5)		35
Boví							1	A					
			1	F	1	F							
			2	K	6	K							
			1	N			1	N					
(Total)	(0)		(4)		(7)		(2)		(0)		(0)		13
Conill													
			2	B	3	A					2	B	
					5	B							
					1	K							
(Total)	(0)		(2)		(9)		(0)		(0)		(2)		13
Porc													
					3	A							
					1	F							
					16	K					1	K	
					1	L							
					1	N							
(Total)	(0)		(0)		(22)		(0)		(0)		(1)		23
TOTAL	7		15		41		11		2		8		84

Taula 4.27. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen humà segons la seva procedència, l'any d'aïllament i el patró de resistència a diferents antimicrobians.

	1993		1994		1998		1999		2000		TOTAL
	Nº	Cat.	Nº	Cat.	Nº	Cat.	Nº	Cat.	Nº	Cat.	
Intrahosp.									1	A	
									4	B	
									3	C	
									2	D	
									1	E	
							1	F	4	F	
							1	G			
									3	K	
							1	L			
							1	M			
							1	N	1	N	
(Total)	(0)		(0)		(0)		(5)		(19)		24
Extrahosp.									4	A	
									3	B	
									6	C	
									2	D	
									7	F	
									1	J	
							1	K	12	K	
							1	L	3	L	
							1	M			
							3	N	3	N	
(Total)	(0)		(0)		(0)		(6)		(41)		47
N.D.	1	C							1	B	
	1	F							1	C	
									1	F	
			1	H	1	G					
			2	K	1	K					
					2	L					
					1	M					
			1	N	3	N					
(Total)	(2)		(4)		(8)		(0)		(3)		17
TOTAL	2		4		8		11		63		88

(**Intrahosp.**: Intrahospitalària; **Extrahosp.**: Extrahospitalària; **N.D.**: no determinada)

Per tal de conèixer si hi ha alguna relació entre la presència de mutacions i la susceptibilitat a les diferents quinolones amb la multiresistència a altres antimicrobians, s'han analitzat conjuntament els tres paràmetres. En aquest anàlisi es va observar que, independentment del subgrup al que pertanyin les soques, un 68% de les d'origen animal que no contenen cap de les mutacions estudiades i són majoritàriament sensibles a les quinolones (Grup I), presenten només una resistència o cap a algun dels antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones. S'ha de destacar, però, que un 29% són resistents a tres o a quatre d'aquests antimicrobians (dades no presentades).

Pel contrari, pel que fa a les soques d'origen animal i humà resistents a l'àcid nalidíxic, també independentment del subgrup al que pertanyin, entre les que contenen 3 o 4 mutacions, dues en el gen *gyrA* i una o dues en el gen *parC*, (Grups VII i VIII) s'observa que el percentatge de multiresistents a tres, quatre o cinc antimicrobians és molt més alt, no trobant-se pràcticament cap soca sensible o amb una sola resistència (Taules 4.28 i 4.29). El mateix s'aprecia entre els dobles mutants (Grups IV i V), on els percentatges més alts corresponen a les soques que presenten tres o quatre resistències. Així mateix, en aquestes taules es pot apreciar que d'entre els mutants GyrA83 (Grup II), un 41 i un 26% d'origen animal i humà, respectivament, són sensibles o només presenten una única resistència a algun dels antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones. Per altra banda, un 12 i un 32% de les soques del Grup II d'origen animal i humà, respectivament, són resistents a dos antimicrobians, mentre que un 43% ho són a tres o quatre antimicrobians amb independència del seu origen. D'entre les soques d'origen animal que presenten una única mutació en el codó 87 del gen *gyrA* (Grup III), un 57% són resistents només a tetraciclina (B). Finalment, assenyalar que el triple mutant d'origen humà (Grup VI) no presenta resistència a cap dels antimicrobians no relacionats amb les quinolones i que la soca salvatge (Grup I) és resistent a ampicil·lina i amoxicil·lina (C).

Taula 4.28. Distribució de les soques d'*E. coli* NaI^R d'origen animal segons les mutacions que presenten i la resistència a diferents antimicrobians.

Grup	No. de resistències	No. de soques	%
II	0	9	26,47
	1	5	14,71
	2	4	11,76
	3	8	23,53
	4	7	20,59
	5	1	2,94
III	0	1	14,29
	1	4	57,14
	3	1	14,29
	4	1	14,29
IV	1	3	33,33
	3	1	11,11
	4	5	55,55
V	1	1	7,14
	3	4	28,57
	4	9	64,28
VII	0	1	5,00
	1	1	5,00
	2	1	5,00
	3	4	20,00
	4	11	55,00
	5	2	10,00

No. de resistències Categories

0	A
1	B
2	C, D
3	F
4	K, L
5	N

Taula 4.29. Distribució de les soques d'*E. coli* d'origen humà segons les mutacions que presenten i la resistència a diferents antimicrobians.

Grup	No. de resistències	No. de soques	%
I	2	1	100,00
II	0	3	9,68
	1	5	16,13
	2	10	32,26
	3	7	22,58
	4	6	19,35
IV	3	1	100,00
V	1	1	33,33
	4	2	66,67
VI	0	1	100,00
VII	0	1	2,22
	1	2	4,44
	2	3	6,67
	3	9	20,00
	4	19	42,22
	5	11	24,44
VIII	2	2	33,33
	3	1	16,67
	4	2	33,33
	5	1	16,67

No. de resistències Categories

0	A
1	B
2	C, D, E
3	F, G, H, J
4	K, L, M
5	N

4.6. RELACIÓ ENTRE ELS DENDOGRAMES I ELS GRUPS MUTACIONALS

Un cop classificades totes les soques segons els grups de mutacions, els subgrups de susceptibilitat a les quinolones i la seva resistència a altres antimicrobians, s'ha procedit a estudiar si hi ha alguna relació entre aquests paràmetres i les agrupacions entre les soques obtingudes en funció de les seves CB. Per això, s'han construït els dendogrames de similituds relatives (SR), però indicant per a cada soca, a més a més, les dades corresponents al grup mutacional (segons les taules 4.16 i 4.17), al subgrup de susceptibilitat a les quinolones (segons les taules 4.21 i 4.22) i la seva resistència a altres antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones (segons la taula 4.25). Així, per exemple, la soca d'origen humà denominada "EC_458_00 [Orina/Intrahosp.] VII3 F" és una soca aïllada d'una mostra d'orina de procedència intrahospitalària ([Orina/Intrahosp.]) l'any 2000 (_00), a la que es va assignar el codi EC_458, que presenta una doble mutació en el gen *gyrA* i una altra mutació en el gen *parC* i és "molt resistent" a totes les quinolones (VII3), sent també resistent a tetraciclina, ampicil·lina i amoxicil·lina (F). En aquests dendogrames el fet que les soques s'assenyalin amb el mateix color indica que pertanyen al mateix grup mutacional. Això s'ha fet amb l'objectiu de poder observar fàcilment si les agrupacions obtingudes segons les CB es relacionen també amb el grup mutacional.

Els dendogrames obtinguts per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animal i per a les Nal^R d'origen animal i humà es mostren, respectivament, a les figures 4.6, 4.7 i 4.8. En els dendogrames de les figures 4.6 i 4.7 s'observa com les soques d'*E. coli* d'origen animal s'agrupen, preferentment, amb altres soques de les mateixes característiques, és a dir, que presenten les mateixes mutacions i que, en molts casos, tenen també una similar susceptibilitat a les quinolones i són resistents als mateixos antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones.

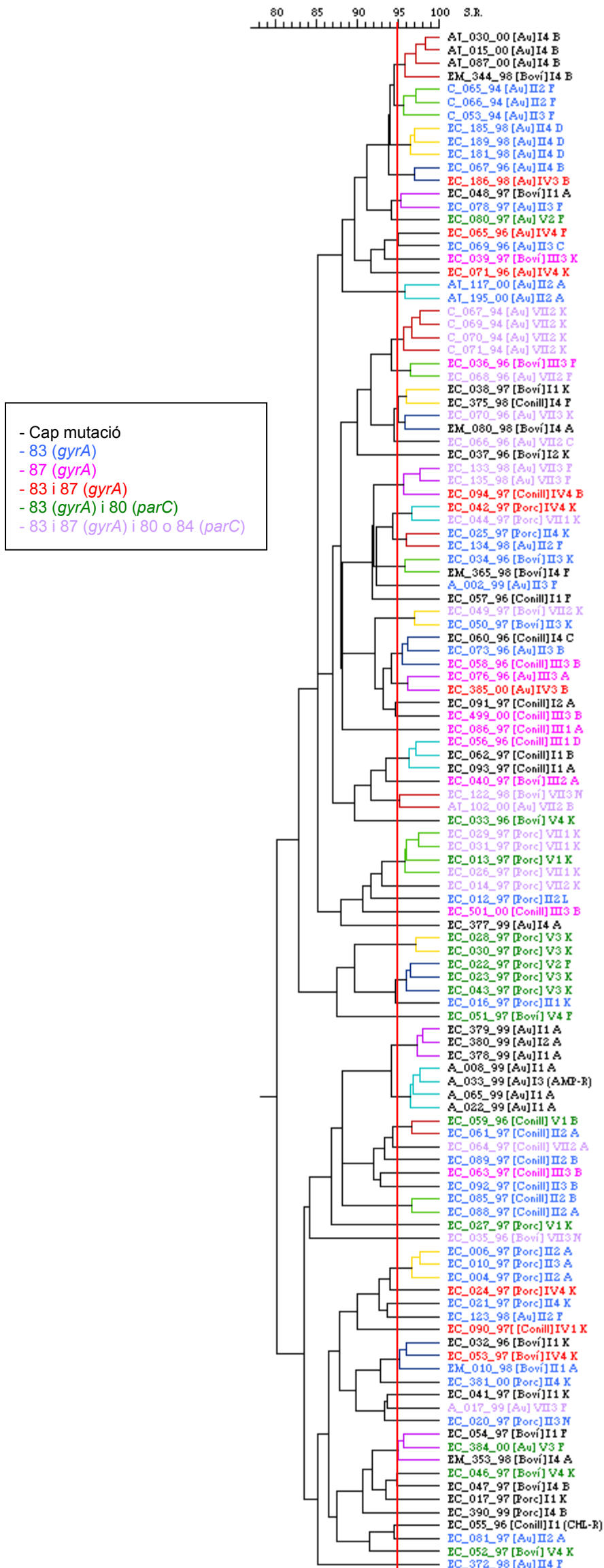


Figura 4.6. Dendrograma de similituds relatives i grups mutacionals per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animal.

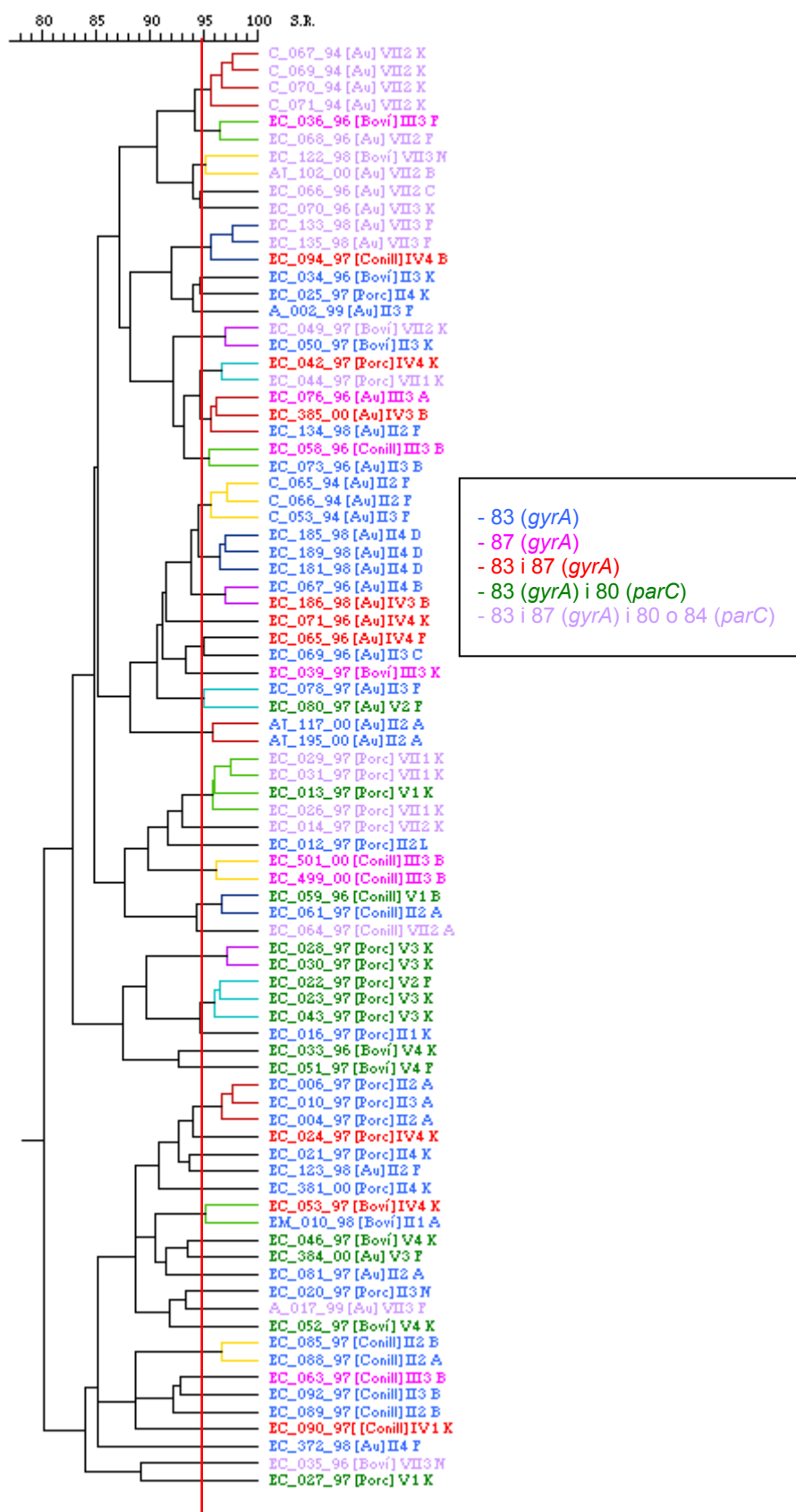


Figura 4.7. Dendrograma de similituds relatives i grups mutacionals per a les soques d'*E. coli* aïllades d'animal NaI^R.

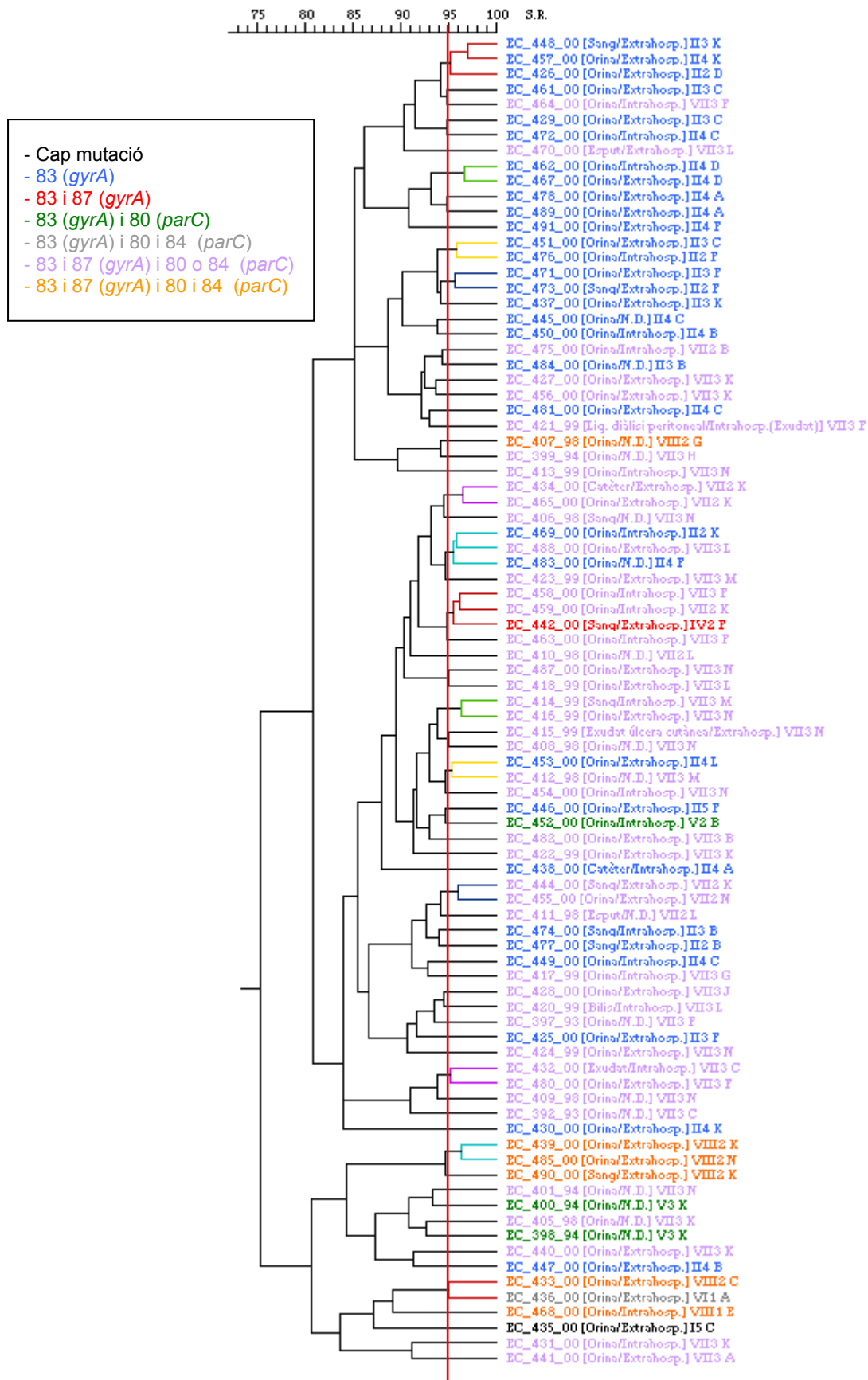


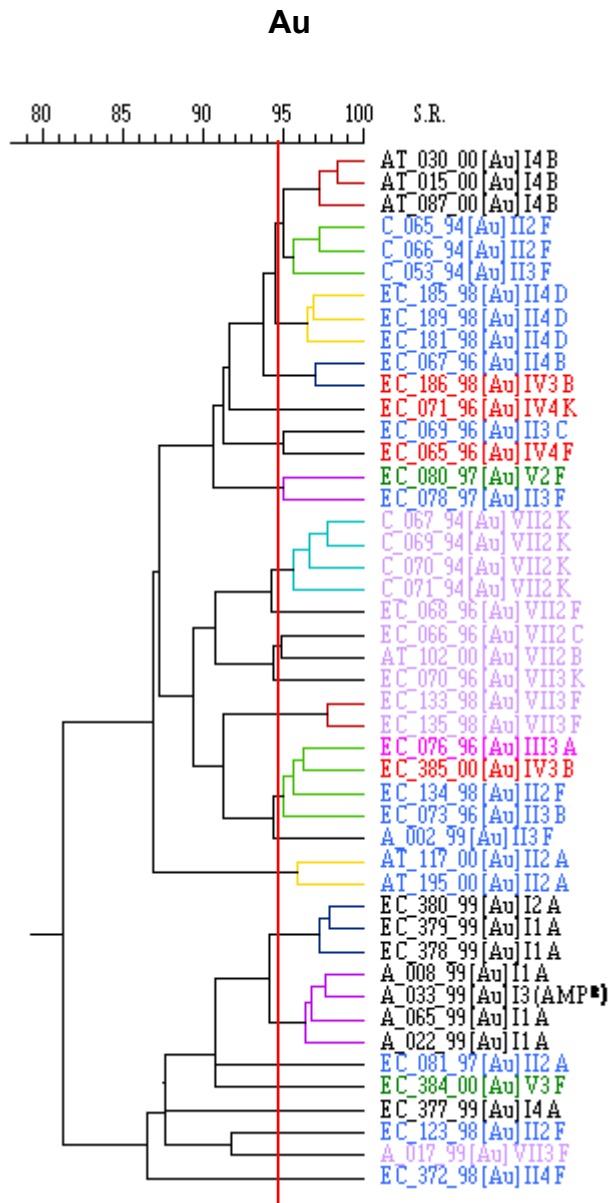
Figura 4.8. Dendograma de similituds relatives i grups mutacionals per a les soques d'*E. coli* aïllades d'humans.

Aquesta agrupació s'observa tant quan s'analitzen totes les soques (Figura 4.6) com quan es tenen en compte només les resistents a l'àcid nalidíxic (Figura 4.7). És de senyalar, però, que en aquest últim cas s'obtenen uns grups de relació una mica diferents que quan s'analitzen totes les soques. Així, per exemple, algunes soques com la EC-122 i la AT-102 estan en el mateix grup, amb un valor de similitud relativa del 94%, que les soques EC-066 i EC-070 quan en l'anàlisi s'inclouen només les soques Nal^R (Figura 4.7). Pel contrari, si es consideren totes les soques d'origen animal, les soques EC-122 i AT-102 es troben en un grup diferent al de les soques EC-066 i EC-070, quedant ara relacionades amb un valor de SR de tan sols un 87% (Figura 4.6).

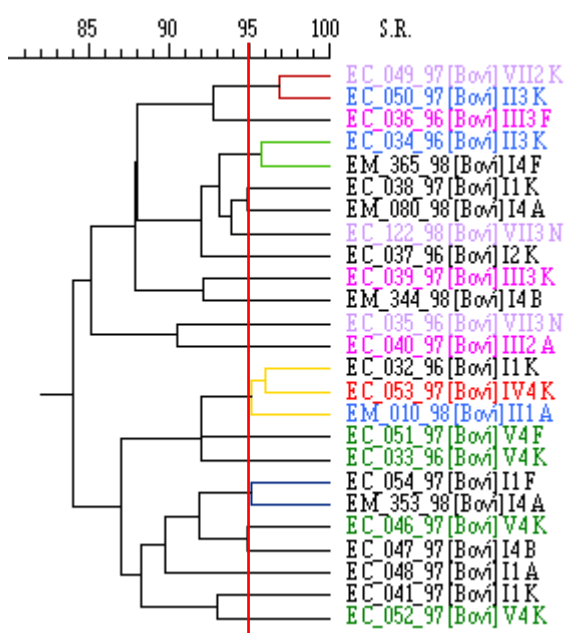
Per a les soques d'origen humà (Figura 4.8) s'observa pràcticament la mateixa agrupació comentada per a les d'origen animal, encara que les aïllades d'humans tenen, majoritàriament, valors de similituds relatives inferiors al 95%.

Per tal de determinar si aquesta agrupació es manté també quan s'analitzen les soques per separat segons l'animal de procedència o segons l'any d'aïllament de les mostres, s'han construït diferents dendogrames. A la figura 4.9 es mostren els dendogrames obtinguts per a les soques d'origen animal separades segons el tipus d'animal del qual provenen. A l'analitzar les soques aïllades d'au i de porc, s'observa una bona agrupació segons les mutacions que presenten, mentre que això no s'aprecia tan clarament per als aïllats de boví i de conill. De la mateixa manera, a la figura 4.10 es mostren els dendogrames obtinguts per a les soques d'origen animal separades segons l'any d'aïllament. En aquests dendogrames es torna a observar molt bé l'agrupació de les soques per grups de mutacions, a excepció de les aïllades l'any 1996, amb les que no s'aprecia una relació tan clara.

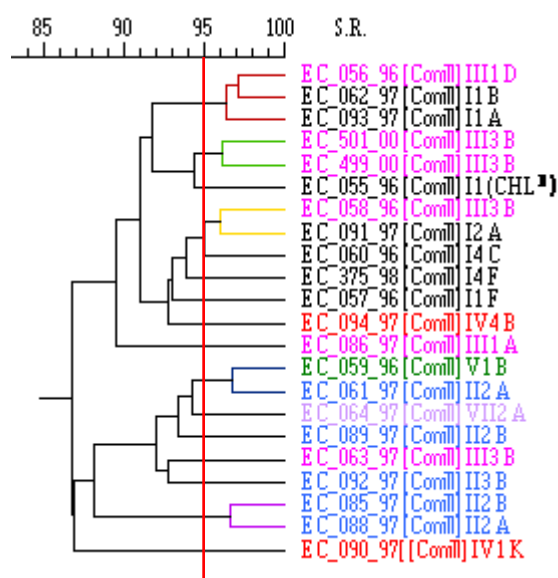
Figura 4.9. Dendogrames de similituds relatives i grups mutacionals de les soques d'*E. coli* d'origen animal, segons el tipus d'animal.



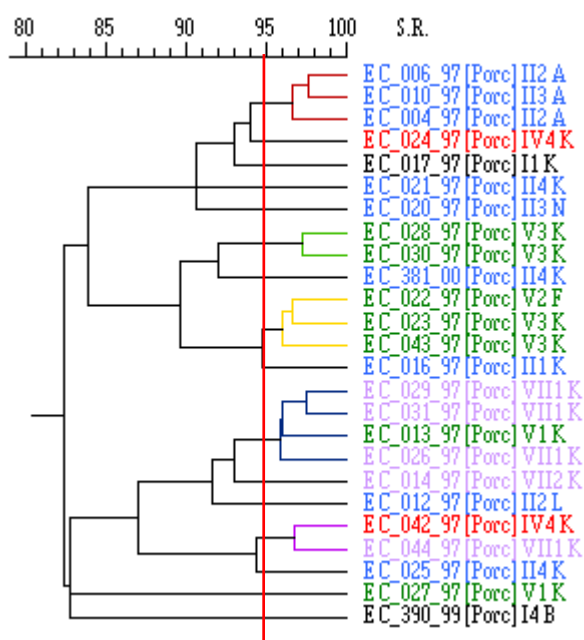
Boví



Conill



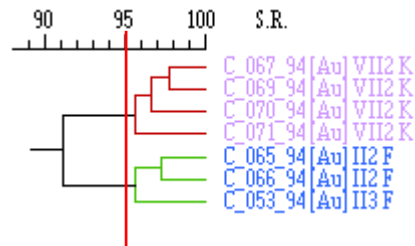
Porc



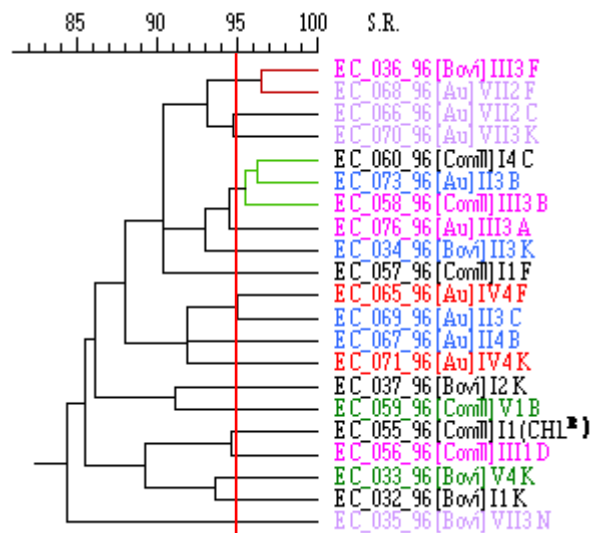
- Cap mutació
- 83 (*gyrA*)
- 87 (*gyrA*)
- 83 i 87 (*gyrA*)
- 83 (*gyrA*) i 80 (*parC*)
- 83 i 87 (*gyrA*) i 80 o 84 (*parC*)

Figura 4.10. Dendogrames de similituds relatives i grups mutacionals de les soques d'*E. coli* d'origen animal, segons l'any d'aïllament.

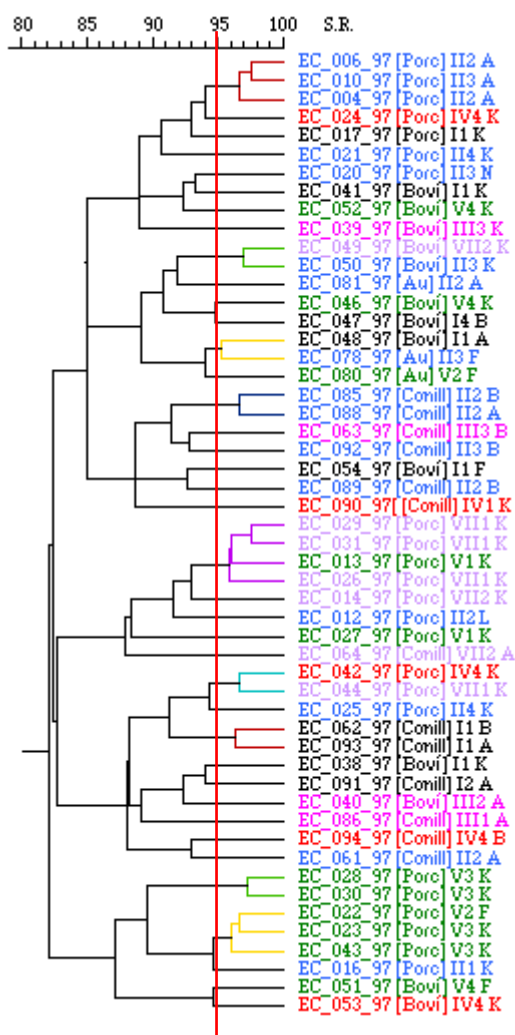
1994



1996

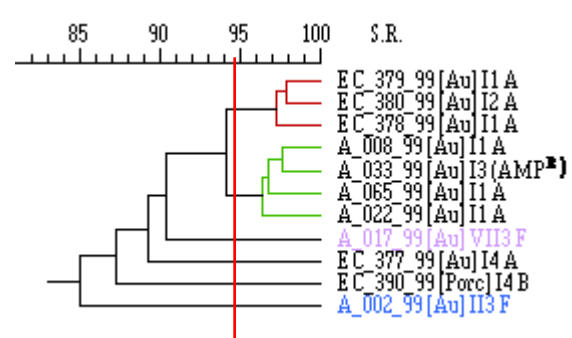


1997

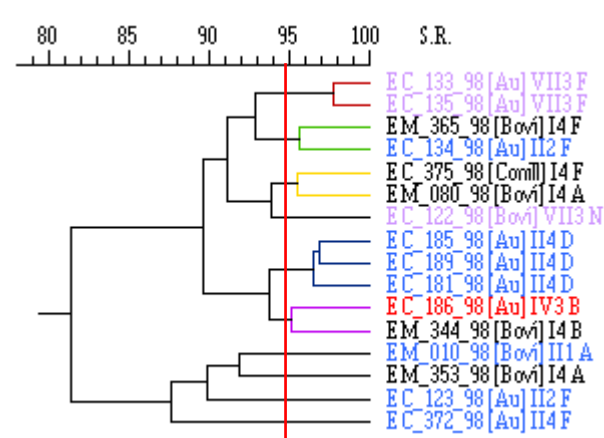


- Cap mutació
 - 83 (*gyrA*)
 - 87 (*gyrA*)
 - 83 i 87 (*gyrA*)
 - 83 (*gyrA*) i 80 (*parC*)
 - 83 i 87 (*gyrA*) i 80 o 84 (*parC*)

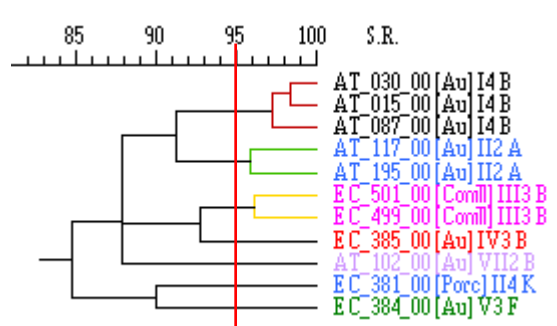
1999



1998

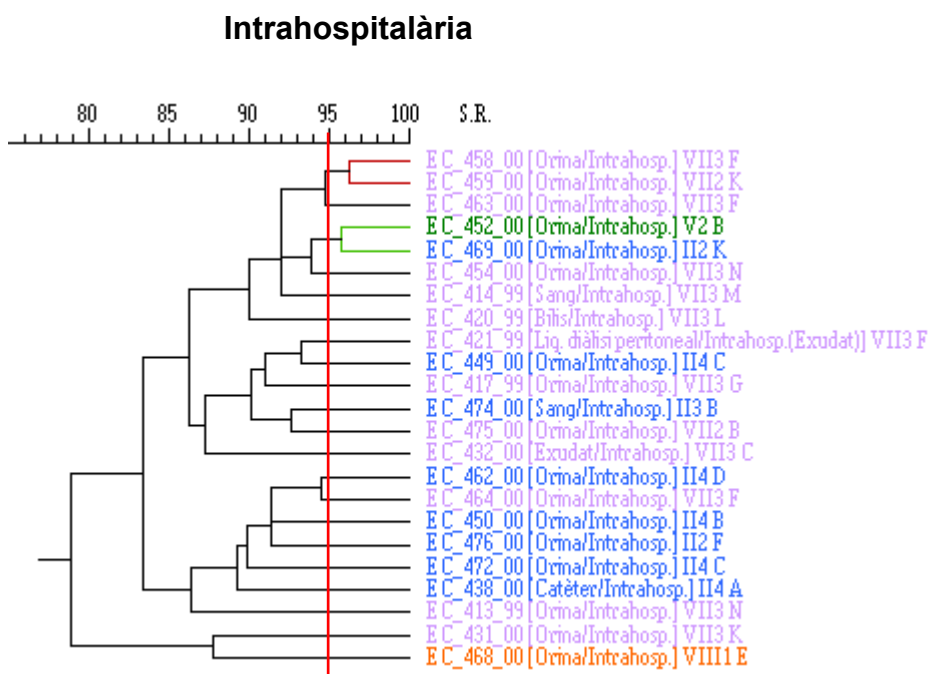


2000

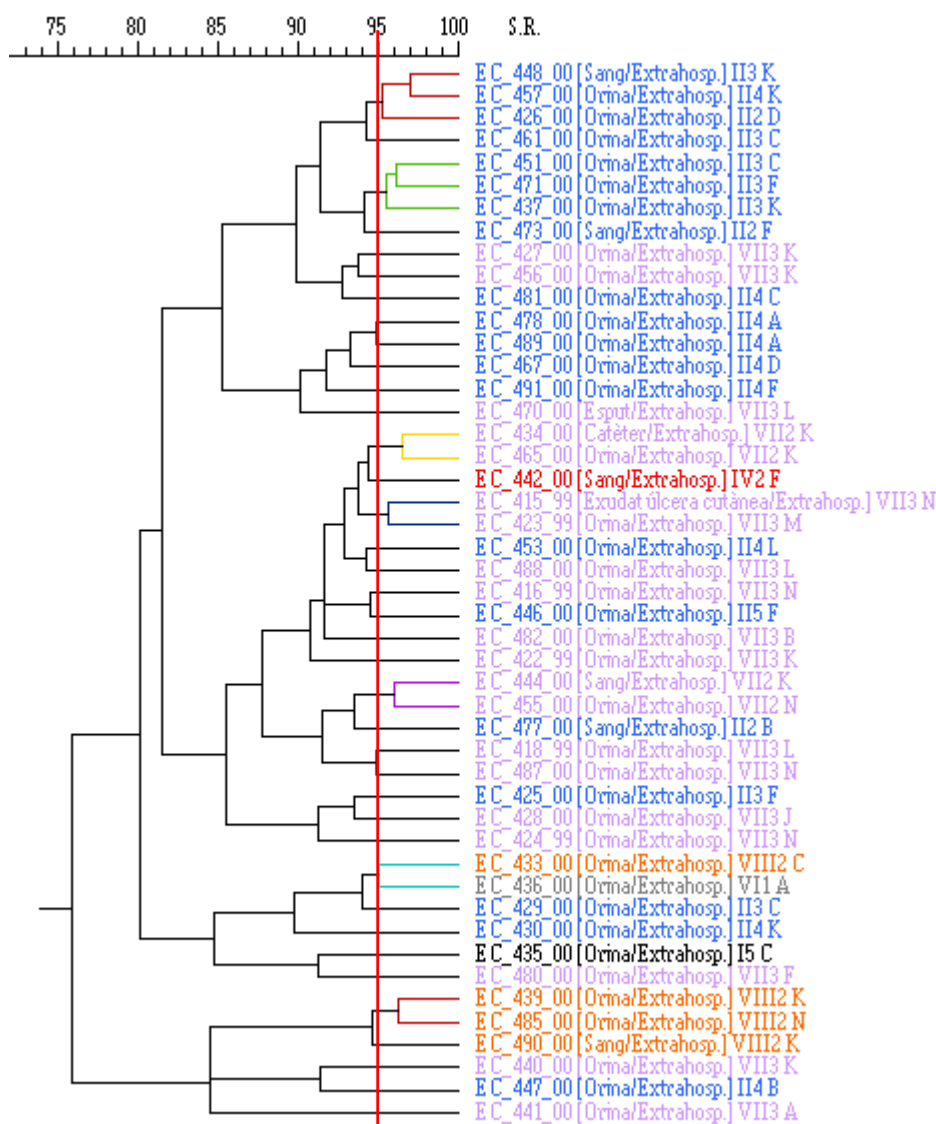


Pel que fa a les soques aïllades d'humans, també s'ha volgut determinar si l'agrupació es manté a l'analitzar les soques per separat segons la procedència de les mostres o segons l'any en el que van ser aïllades. A la figura 4.11 es mostren els dendogrames obtinguts per a les soques d'origen humà separades segons la procedència de les mostres. En aquest cas s'observa molt bé com aquestes soques també s'agrupen preferentment per grups de mutacions. Així mateix, a la figura 4.12 es mostra el dendograma obtingut per a les soques d'origen humà aïllades l'any 2000, apreciand-se també que els grups formats segons les CB inclouen fonamentalment un grup mutacional determinat.

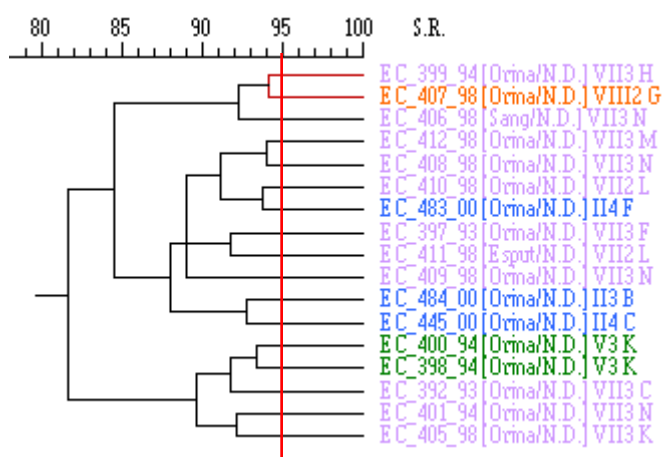
Figura 4.11 Dendogrames de similituds relatives i grups mutacionals de les soques d'*E. coli* d'origen humà, segons la procedència de les mostres.



Extrahospitalària

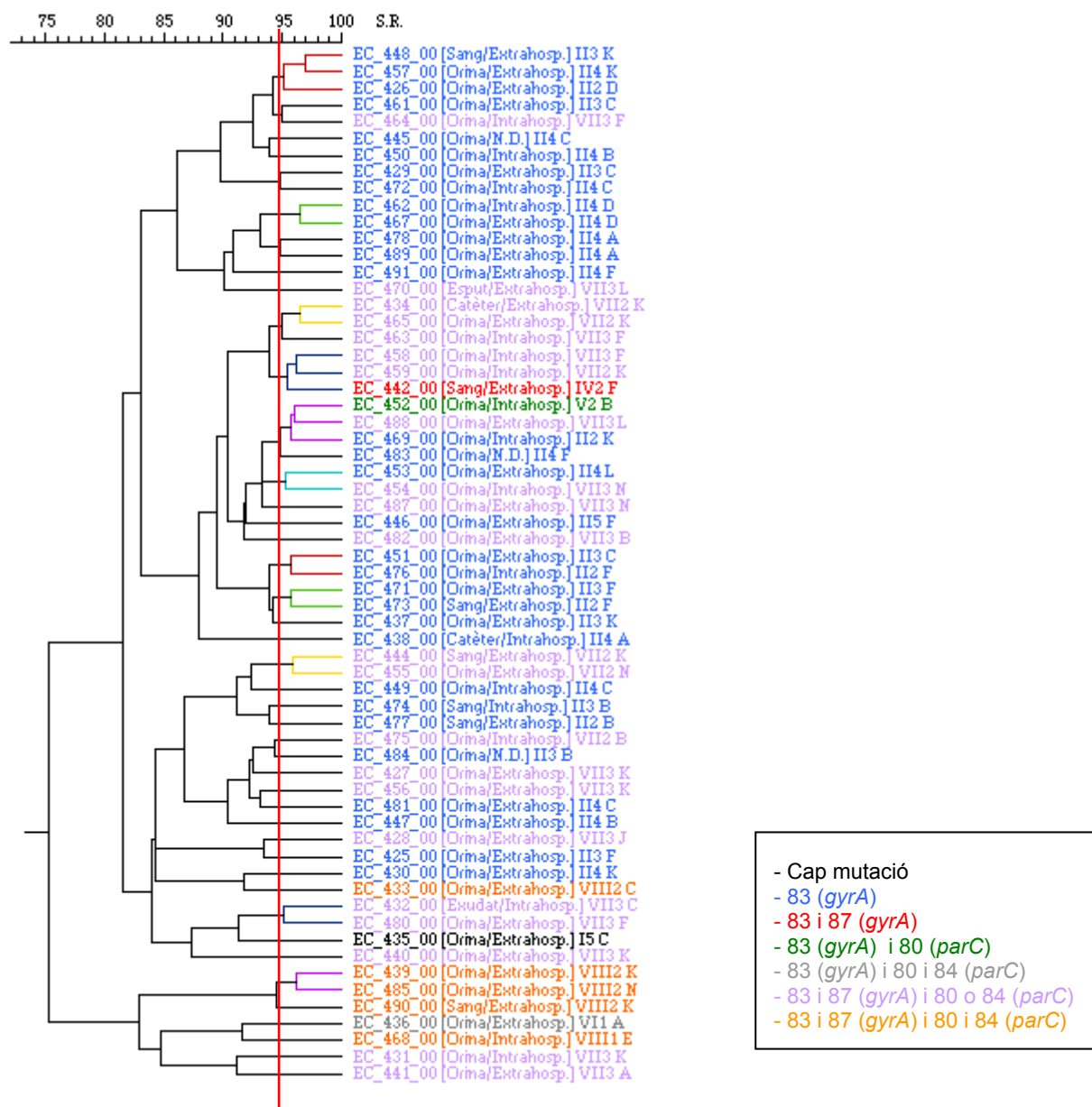


N.D.



- Cap mutació
- 83 (*gyrA*)
- 83 i 87 (*gyrA*)
- 83 (*gyrA*) i 80 (*parC*)
- 83 (*gyrA*) i 80 i 84 (*parC*)
- 83 i 87 (*gyrA*) i 80 o 84 (*parC*)
- 83 i 87 (*gyrA*) i 80 i 84 (*parC*)

Figura 4.12. Dendograma de similituds relatives i grups mutacionals de les soques d'*E. coli* d'origen humà aïllades l'any 2000.



PART B. *Salmonella typhimurium*

4.7. CINÈTIQUES BIOQUÍMIQUES

S'ha estudiat tot el conjunt de soques de *S. typhimurium* NaI^R d'origen animal (Taula 3.3), més les dues soques NaI^S i la soca de col·lecció mitjançant la tècnica de Cinètiques Bioquímiques (CB), amb l'objectiu de conèixer, tal com s'ha fet per a les soques d'*E. coli*, el grau amb el que estan relacionades. Així, s'han construït diferents dendogrames de similituds relatives (SR) en funció de les CB obtingudes. Per a les soques de *S. typhimurium*, però, el punt de tall en el grau de SR s'ha establert en el 93%, per ser d'aquesta manera com s'han obtingut els millors resultats a l'hora d'agrupar soques de *S. typhimurium* d'origen animal, tenint en compte la procedència de les mostres i l'any en el que van ser aïllades (M. Saco, comunicació personal). A les figures 4.13 i 4.14 es mostren els dendogrames obtinguts per a les soques de *S. typhimurium*, indicant per a cada soca, excepte la de col·lecció, el seu codi, l'any d'aïllament i el tipus d'animal del qual va ser aïllada. Així, la soca denominada "S-4407_94 [Au]" és una soca aïllada d'au ([Au]) l'any 1994 (_94) i a la que es va assignar el codi S-4407. Aquests dos dendogrames difereixen en que en el primer un mateix color en el nom de les soques indica que van ser aïllades del mateix tipus d'animal mentre que en el segon mostra que van ser aïllades en el mateix any.

L'anàlisi dels dendogrames mostra un elevat grau de relació entre les soques de *S. typhimurium* utilitzades en aquest treball, distingint-se grups amb valors de SR superiors al 93% que contenen un gran nombre de soques. També s'observa molt clarament que les soques s'agrupen segons el tipus d'animal del qual provenen i segons l'any en el que van ser aïllades.

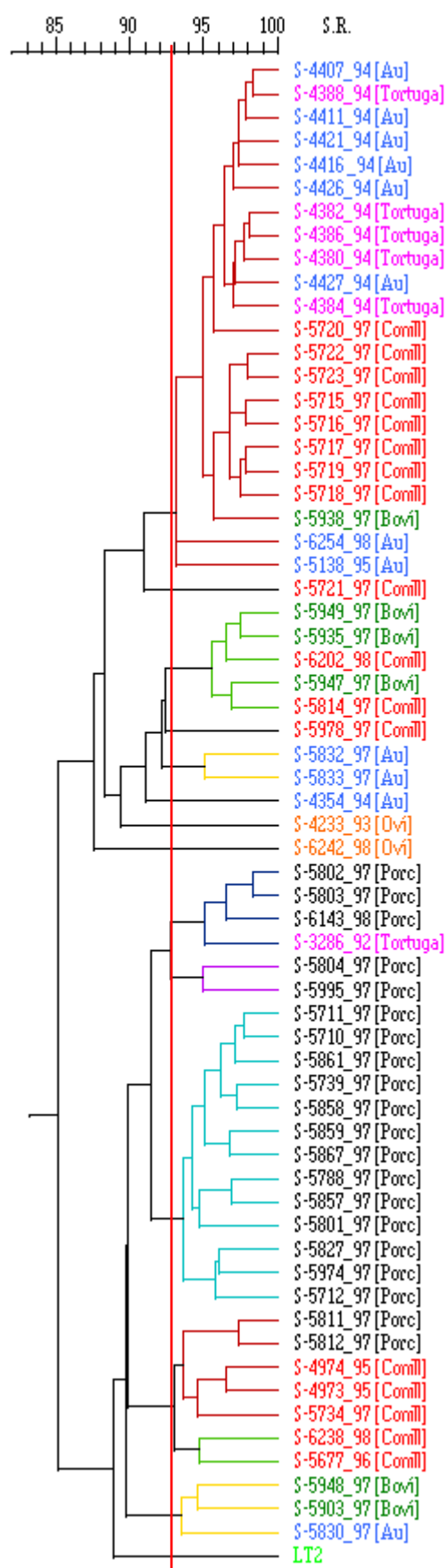


Figura 4.13. Dendograma de similituds relatives i tipus d'animal per a les soques de *S. typhimurium*.

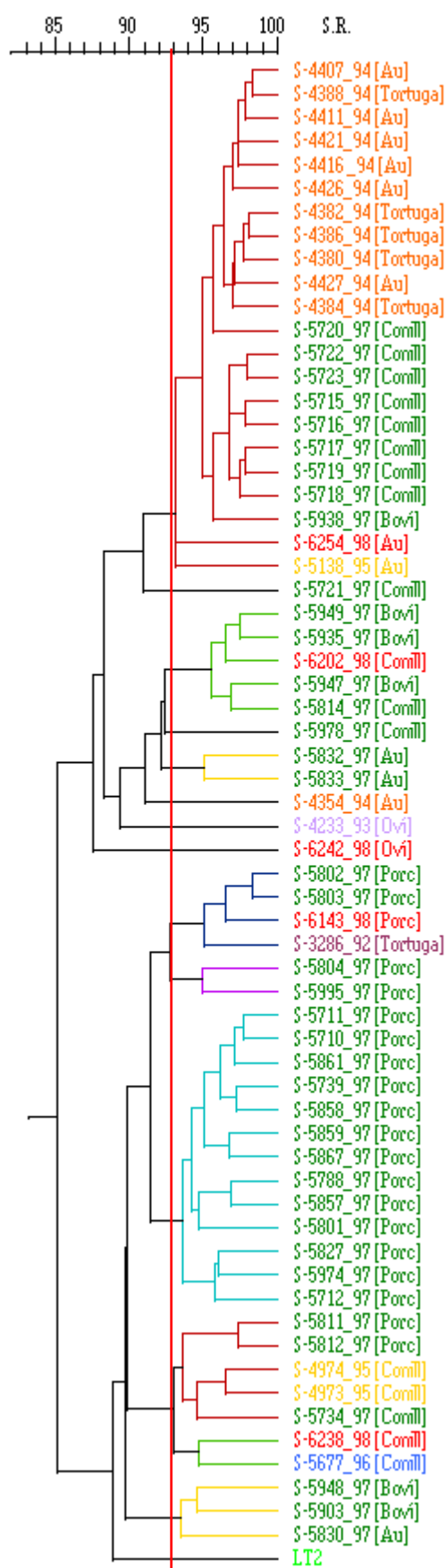


Figura 4.14. Dendograma de similituds relatives i any d'aïllament per a les soques de *S. typhimurium*.

4.8. SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES

Amb l'objectiu de conèixer la susceptibilitat a quinolones de les soques de *S. typhimurium* estudiades, s'han realitzat antibiogrames mitjançant el mètode de difusió amb discs impregnats d'antibiòtics. A la taula 4.30 es mostren les concentracions mínimes inhibidores (CMI_s), en µg/ml, de la norfloxacin, l'enrofloxacin i la ciprofloxacina per a cada soca, ressaltant-se en negreta els valors de CMI que indiquen resistència a una fluoroquinolona en concret.

Taula 4.30. Concentració Mínima Inhibidora de les diferents fluoroquinolones per a les soques de *S. typhimurium* NaI^R.

Soca	CMI (µg/ml)		
	NOR	ENR	CIP
S-3286	≥ 57,35	≥ 38,67	≥ 43,08
S-4233	1,63	1,49	0,32
S-4354	1,81	0,78	0,38
S-4380	1,40	0,44	0,31
S-4382	1,76	1,39	0,37
S-4384	1,30	1,69	0,21
S-4386	1,49	0,40	0,38
S-4388	1,78	0,83	0,47
S-4407	0,85	1,53	0,40
S-4411	2,05	1,48	0,61
S-4416	2,08	0,75	0,66
S-4421	1,11	1,12	0,66
S-4426	2,92	1,11	0,68
S-4427	1,03	0,73	0,14
S-4973	0,54	0,37	0,32
S-4974	1,01	0,40	0,27
S-5138	1,91	1,12	0,21
S-5677	1,63	0,86	0,24
S-5710	2,45	0,69	0,53
S-5711	3,36	0,92	0,29
S-5715	1,00	0,28	0,17
S-5716	1,08	0,46	0,30
S-5717	0,67	0,63	0,14
S-5718	0,40	0,35	0,21
S-5719	0,68	0,40	0,12
S-5720	0,51	0,52	0,11
S-5721	0,44	0,38	0,12
S-5722	0,66	0,68	0,18
S-5723	0,63	0,56	0,19
S-5734	1,02	0,60	0,17
S-5739	2,28	1,66	0,37

Taula 4.30. continuació

Soca	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		
	NOR	ENR	CIP
S-5788	1,69	0,82	2,01
S-5801	5,86	1,56	0,76
S-5802	4,41	2,25	0,73
S-5803	4,42	1,34	0,48
S-5804	5,15	1,53	0,28
S-5811	2,09	1,73	0,56
S-5812	6,22	0,71	0,47
S-5814	0,70	0,29	0,17
S-5827	0,14	0,09	0,08
S-5830	0,70	0,29	0,23
S-5832	0,70	0,48	0,15
S-5833	0,51	0,52	0,31
S-5857	2,23	1,61	0,83
S-5858	1,79	0,52	0,67
S-5859	6,79	1,63	0,72
S-5861	4,45	1,74	0,70
S-5867	4,04	0,92	0,65
S-5903	3,05	1,60	1,13
S-5935	0,42	0,43	0,48
S-5938	0,57	0,36	0,24
S-5947	1,65	0,52	0,10
S-5948	1,37	0,44	0,16
S-5949	0,67	0,54	0,33
S-5974	5,75	0,09	0,40
S-5995	1,32	1,45	0,64
S-6143	3,85	1,01	0,62
S-6202	0,28	0,15	0,11
S-6238	0,35	0,87	0,09
S-6242	0,25	0,36	0,14
S-6254	0,33	0,38	0,14

NOR: Norfloxacina; ENR: Enrofloxacina; CIP: Ciprofloxacina

NOR S: $\leq 6,31$ NOR I: $>6,31- <16,25$ NOR R: $\geq 16,25$

ENR S: $\leq 1,63$ ENR I: $>1,63- <5,16$ ENR R: $\geq 5,16$

CIP S: $\leq 1,36$ CIP I: $>1,36- <4,79$ CIP R: $\geq 4,79$

(S: sensible, I: intermig, R: resistant)

Els valors de CMI_s obtinguts s'han utilitzat per a classificar les soques estudiades tenint en compte la seva susceptibilitat a les fluoroquinolones, distingint entre R (resistent), I (intermig) i S (sensible). Com es mostra a la taula 4.31, gairebé tots els aïllats són sensibles als tres compostos. De fet, només una soca, aïllada de tortuga l'any 1992, és resistent a les tres fluoroquinolones. De les set soques amb nivells de susceptibilitat intermitjos

a algun d'aquests antimicrobians, sis són aïllats de porc l'any 1997 i l'altra procedeix de tortuga i va ser aïllada l'any 1994.

Taula 4.31. Distribució de les soques de *S. typhimurium* Nal^R segons la susceptibilitat a les fluoroquinolones.

	Susceptibilitat (CMI, µg/ml)	No. de soques	%
Norfloxacina	R (≥16,25)	1	1,64
	I (>6,31-<16,25)	1	1,64
	S (≤6,31)	59	96,72
Enrofloxacina	R (≥5,16)	1	1,64
	I (>1,63-<5,16)	5	8,20
	S (≤1,63)	55	90,16
Ciprofloxacina	R (≥4,79)	1	1,64
	I (>1,36-<4,79)	1	1,64
	S (≤1,36)	59	96,72

(**R**: resistent, **I**: intermig, **S**: sensible)

(LT2, soca de col.lecció: Nall, NorS, EnroS i CiproS)

(S-5712 i S-5978, controls: NalS, NorS, EnroS i CiproS)

4.9. DETECCIÓ DE MUTACIONS EN EL GEN *gyrA*

En aquesta part del treball, s'ha determinat la seqüència de la regió QRDR del gen *gyrA* de les diferents soques de *S. typhimurium* estudiades i s'han desenvolupat dues metodologies diferents per tal de detectar la presència de mutacions en els codons 83 i 87 d'aquest gen, evitant la necessitat de seqüenciar la regió. Cal indicar que no s'ha estudiat la regió QRDR del gen *parC*, donat que fins al moment no hi ha descrita cap mutació en aquest gen que es relacioni amb la presència de resistència a quinolones.

Així, s'ha seqüenciat la regió QRDR del gen *gyrA* de les 64 soques de *S. typhimurium* estudiades, s'ha analitzat la seqüència obtinguda i s'ha deduït la seqüència d'aminoàcids corresponent a la regió QRDR del gen *gyrA* de cada soca. A la taula 4.32 es mostren els residus d'aminoàcids deduïts per als codons 83 i 87 de la proteïna GyrA. Pel que fa a les mutacions en aquestes posicions, les majoritàries són la transversió CG → AT i la transició GC → AT en els codons 83 i 87, respectivament, que donen lloc als canvis Ser83 → Tyr i Asp87 → Asn, no havent-se detectat cap mutació silenciosa. A l'analitzar la distribució d'aquests canvis en les diferents soques de *S. typhimurium*, s'observa que cinc soques no presenten mutació en cap de les dues posicions, mentre que les altres són mutants en el codó 83 (20) o en el 87 (39), no trobant-se cap doble mutant.

Com a alternativa al mètode de seqüenciació per a la detecció de mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* de *S. typhimurium*, s'han desenvolupat **dues metodologies** diferents: la **hibridació de colònies amb sondes específiques** i la **PCR a temps real** per a la detecció fluorimètrica de les mutacions. Mentre que en la primera no és necessari obtenir DNA, ja que es treballa directament des de colònia, la segona s'ha posat a punt a partir de DNA cromosòmic. De totes maneres, s'ha començat a provar el mètode des de colònia, obtenint-se uns molt bons resultats preliminars.

Taula 4.32. Variabilitat en la seqüència de DNA de la regió QRDR del gen *gyrA* en les soques de *S. typhimurium*.

Aminoàcid (Codó)	No. de soques
Posició 83	
Ser83 (TCC)	44
Tyr83 (TAC)	14
Phe83 (TTC)	6
Posició 87	
Asp87 (GAC)	25
Asn87 (AAC)	22
Gly87 (GGC)	17

El primer mètode, com s'ha dit, ha estat el **d'hibridació de colònies amb una sonda específica (SalSer83**, descrita a l'apartat de Materials i Mètodes) que conté la seqüència salvatge de la regió de DNA que comprèn el codó 83. A diferència de les sondes dissenyades per a detectar mutacions en *E. coli*, aquesta sonda no està centrada en la posició on es vol detectar la mutació, ja que s'ha dissenyat de tan sols 18 nucleòtids, per tal d'evitar la formació d'estructures secundàries. Per tant, amb la hibridació de colònies amb la sonda SalSer83 es pretén diferenciar les soques salvatges de les mutants en aquesta posició. No s'ha estudiat amb aquest mètode, fins al moment, la presència de mutacions en la posició 87 del gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

Per a desenvolupar aquest mètode, inicialment es van triar algunes soques, tant salvatges com mutants, i es va procedir a determinar les millors condicions d'hibridació, sent 48°C la temperatura d'hibridació amb la que s'han obtingut millors resultats. Seguidament, s'ha procedit a la hibridació de les colònies de totes les soques amb la sonda SalSer83. Amb els resultats

obtinguts s'ha determinat el grau de **sensibilitat** i d'**especificitat** de la sonda, el qual ha estat d'un 77 (34/44) i d'un 90% (18/20), respectivament. Això indica que a través de la hibridació de colònies de *S. typhimurium* amb la sonda SalSer83 es pot determinar la presència d'una seqüència salvatge o la presència de mutació en la posició 83 del gen *gyrA* amb un elevat grau de fiabilitat.

El segon mètode desenvolupat ha estat el de **detecció de mutacions per PCR a temps real**, que permet la detecció fluorimètrica de les mutacions, tal com s'ha explicat a l'apartat de Materials i Mètodes. Els resultats obtinguts (T_m) per a totes les soques de *S. typhimurium* d'origen animal estudiades, després d'haver posat a punt el mètode amb unes poques soques utilitzades com a control, entre les que s'inclou la soca de col·lecció LT2, mostren que les soques que contenen el mateix codó en les posicions 83 i 87 del gen *gyrA* presenten una T_m similar (dades no presentades). Per tal de fer més complert aquest anàlisi, s'ha determinat també la T_m de tres soques, proporcionades pel Dr. Ernesto Liebana (Veterinary Laboratories Agency – Weybridge, Regne Unit), que contenen la mutació Asp87 → Tyr en el gen *gyrA*. Aquesta mutació s'ha descrit en poques ocasions i no s'ha trobat, entre les soques de *S. typhimurium* analitzades en aquest treball, cap portadora d'aquest canvi.

Per tal d'intentar establir si mitjançant aquest mètode es poden diferenciar els diferents codons mutants del salvatge, s'ha calculat el promig i la desviació estàndard dels valors de T_m obtinguts en cada cas, i s'ha utilitzat com a criteri per establir un interval el valor donat pel doble de la desviació estàndard (García de Viedma *et al.*, 2002). A la taula 4.33 es mostren aquests valors per a cada mutació, incloent la Asp87 → Tyr, així com per a la seqüència salvatge en els codons 83 i 87 del gen *gyrA*. A la figura 4.15 es mostren gràficament els valors de T_m obtinguts per una soca salvatge i pels diferents mutants. Els resultats obtinguts indiquen que es poden diferenciar clarament les soques salvatges i els mutants Asp87 → Gly i Ser83 → Tyr

dels canvis Ser83 → Phe, Asp87 → Asn i Asp87 → Tyr. En canvi, per aquest mètode, amb les soques portadores d'aquests tres canvis s'obtenen valors de T_m que es solapen, tot i que les que presenten la mutació Ser83 → Phe tenen, en general, uns valors de T_m inferiors als de les que contenen els canvis Asp87 → Asn i Asp87 → Tyr. Caldria una altra sonda, específica per alguna d'aquestes mutacions, o un altre mètode diferent per a poder diferenciar aquests dos canvis.

Taula 4.33. Valors de T_m i interval de confiança de la seqüència salvatge i de les mutants en el gen *gyrA* de *S. typhimurium*.

Mutació per seqüenciació	T_m (°C)		
	Promig	INTERVAL	
Ser83 → Tyr	61,38	61,12	61,63
Ser83 → Phe	61,97	61,82	62,11
Asp87 → Asn	62,22	61,92	62,52
Asp87 → Tyr	62,39	62,23	62,55
Asp87 → Gly	63,39	62,95	63,83
wt	68,14	67,65	68,62

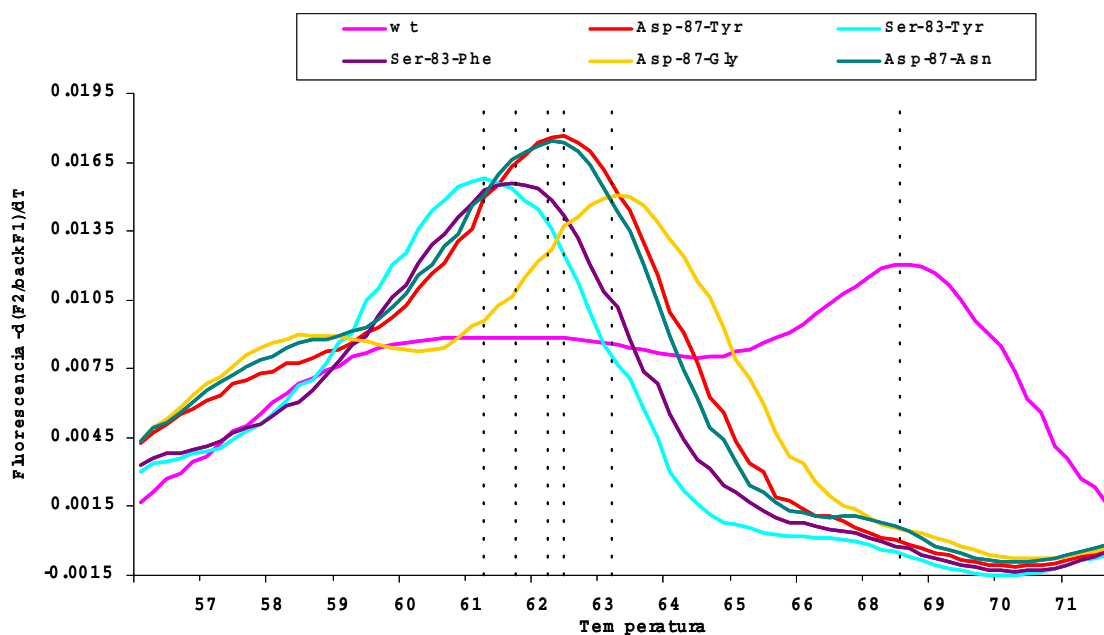


Figura 4.15. Representació gràfica dels valors de T_m obtinguts mitjançant PCR a temps real per a una soca salvatge i pels diferents mutants.

4.10. RELACIÓ ENTRE LES MUTACIONS EN LA REGIÓ QRDR DEL GEN *gyrA* I LA SUSCEPTIBILITAT A QUINOLONES

Una vegada conegudes les diferents mutacions en els codons 83 i 87 del gen *gyrA* i la susceptibilitat de les diferents soques de *S. typhimurium* a les quinolones, s'ha procedit a establir les possibles relacions entre ambdós paràmetres. A la taula 4.34 es mostra la classificació de les soques de *S. typhimurium* segons la mutació que presenten en el gen *gyrA*. Pel que fa a la seqüència de la regió QRDR, s'han distingit tres grups. El Grup I correspon a la seqüència salvatge, mentre que el Grup II i el Grup III als mutants en els codons 83 i 87, respectivament.

En el Grup I s'inclouen les dues soques sensibles a les quinolones i la LT2 que presenta un nivell de susceptibilitat a l'àcid nalidíxic (Ia), i també una soca resistent a aquest antimicrobià així com una altra resistent a totes

les quinolones (Ib). El Grup II, que representa un 31,25% del total, conté aïllats amb uns nivells de susceptibilitat a totes les quinolones força similars, independentment del tipus de mutació en aquesta posició. En el Grup III s'inclouen la majoria de les soques estudiades, amb un percentatge del 60,94%. És de destacar que en aquest grup es troben sis dels set aïllats que presenten un nivell de susceptibilitat intermig a alguna de les tres fluoroquinolones i que, a més a més, aquestes soques presenten concretament la mutació Asp87 → Asn (IIIa).

Taula 4.34. Classificació de les soques de *S. typhimurium* segons les mutacions que presenten.

Grup	Mutant	Canvi d'aminoàcid	No. de soques	%
I	-	- (Ia)	3	4,69
		- (Ib)	2	3,12
	(total)		5	7,81
II	83 (<i>gyrA</i>)	Ser83 → Tyr (IIa)	14	21,87
		Ser83 → Phe (IIb)	6	9,38
	(total)		20	31,25
III	87 (<i>gyrA</i>)	Asp87 → Asn (IIIa)	22	34,38
		Asp87 → Gly (IIIb)	17	26,56
	(total)		39	60,94

Per altra banda, a la taula 4.35 es mostra la distribució de les soques estudiades en funció dels grups mutacionals, la seva procedència i l'any d'aïllament. En ella es pot observar que totes les procedents d'au i més d'un 83% de les procedents de tortuga són mutants en el codó 83 (Grup II), mentre que més d'un 80% dels aïllats de boví, conill i porc contenen una única mutació en el codó 87 (Grup III). Pel que fa a l'any d'aïllament, s'ha de destacar que totes les soques aïllades l'any 1994 presenten una única

mutació en el codó 83 (Grup II), mentre que un 82,5% de les aïllades l'any 1997 són mutants en el codó 87 (Grup III).

Taula 4.35. Distribució de les soques de *S. typhimurium* segons la seva procedència, l'any d'aïllament i les mutacions que presenten.

Grup	Procedència	Any d'aïllament							Subtotal (%) [*]	TOTAL (%)
		1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998		
I	Au	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	5 (7,81)
	Boví	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	Conill	0	0	0	0	0	1	0	1 (5,88)	
	Oví	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	Porc	0	0	0	0	0	2	0	2 (10,00)	
	Tortuga	1	0	0	0	0	0	0	1 (16,67)	
	Col·lecció	-	-	-	-	-	-	-	1 (100,00)	
II	Au	0	0	7	1	0	3	1	12 (100,00)	20 (31,25)
	Boví	0	0	0	0	0	1	0	1 (16,67)	
	Conill	0	0	0	0	1	0	1	2 (11,76)	
	Oví	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	Porc	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	Tortuga	0	0	5	0	0	0	0	5 (83,33)	
	Col·lecció	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,00)	
III	Au	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	39 (60,94)
	Boví	0	0	0	0	0	5	0	5 (83,33)	
	Conill	0	0	0	2	0	11	1	14 (82,35)	
	Oví	0	1	0	0	0	0	1	2 (100,00)	
	Porc	0	0	0	0	0	17	1	18 (90,00)	
	Tortuga	0	0	0	0	0	0	0	0 (0,00)	
	Col·lecció	-	-	-	-	-	-	-	0 (0,00)	
									64	

^{*} Percentatge respecte al total de soques aïllades de cada procedència.

No. total de soques → Au: 12; Boví: 6; Conill: 17; Oví: 2; Porc: 20; Tortuga: 6; Col·lecció: 1.

4.11. SUSCEPTIBILITAT A ALTRES ANTIMICROBIANS

Malgrat l'elevada susceptibilitat de les soques de *S. typhimurium* a les fluoroquinolones, s'ha estudiat també la seva susceptibilitat a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina, amoxicil·lina i cefalexina, mitjançant el mètode de difusió amb discs impregnats d'antibiòtics. A la taula 4.36 es mostren les concentracions mínimes inhibidores (CMI_s), en µg/ml, d'aquests cinc antimicrobians, destacant-se en negreta aquells valors de CMI que indiquen resistència. És de destacar que la majoria de soques analitzades són resistents a la tetraciclina i que, en molts casos, ho són també al cloranfenicol, l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina, mentre que cap és resistent a la cefalexina. De fet, quan s'estudia la distribució dels aïllats de *S. typhimurium* segons la seva resistència als cinc antimicrobians estudiats, es poden incloure tots ells en 5 categories, les quals es mostren a la taula 4.37. En aquesta taula s'observa que un 19,67% són només resistents a la tetraciclina i que un 67,21% ho són, a més a més, al cloranfenicol, l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina.

Taula 4.36. Concentració Mínima Inhibidora de diferents antimicrobians per a les soques de *S. typhimurium* Nal^R.

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
S-3286	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	4,83
S-4233	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,60
S-4354	≥ 114,51	3,64	3,95	1,81	7,09
S-4380	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,17
S-4382	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	4,62
S-4384	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,04
S-4386	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,09
S-4388	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,00
S-4407	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,49
S-4411	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,13
S-4416	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,88
S-4421	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,16
S-4426	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,21
S-4427	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,48
S-4973	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,83
S-4974	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,94
S-5138	2,60	2,72	≥ 107,59	≥ 111,33	7,44
S-5677	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,79

Taula 4.36. continuació

Soca	CMI (µg/ml)				
	TET	CHL	AMP	AMX	LEX
S-5710	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,86
S-5711	≥ 114,59	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,86
S-5715	61,71	6,80	4,35	1,13	7,53
S-5716	48,51	5,93	5,78	1,24	8,60
S-5717	42,51	2,60	3,49	1,89	7,40
S-5718	2,05	5,08	2,79	1,90	8,49
S-5719	42,51	3,89	4,07	1,07	7,66
S-5720	44,56	3,59	1,74	0,67	20,60
S-5721	41,13	4,59	4,41	1,77	7,86
S-5722	39,51	3,84	4,09	1,88	6,51
S-5723	≥ 114,51	6,43	4,68	2,20	10,17
S-5734	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	11,96
S-5739	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	12,06
S-5788	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,12
S-5801	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,46
S-5802	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,91
S-5803	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,09
S-5804	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	4,91
S-5811	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,90
S-5812	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,91
S-5814	56,42	3,59	1,13	0,67	5,70
S-5827	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70
S-5830	2,07	2,82	≥ 107,59	≥ 111,33	4,60
S-5832	3,33	3,59	≥ 107,59	≥ 111,33	10,70
S-5833	1,64	3,59	≥ 107,59	≥ 111,33	5,70
S-5857	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,48
S-5858	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	1,95
S-5859	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,07
S-5861	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,98
S-5867	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	6,37
S-5903	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,66
S-5935	≥ 114,51	≥ 355,61	1,79	1,17	8,57
S-5938	≥ 114,51	≥ 355,61	2,49	1,23	7,93
S-5947	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,35
S-5948	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,73
S-5949	≥ 114,51	≥ 355,61	4,15	1,24	6,86
S-5974	≥ 114,59	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	7,66
S-5995	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	8,10
S-6143	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,21
S-6202	38,23	2,25	1,42	2,60	10,98
S-6238	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	10,43
S-6242	42,71	6,33	1,85	1,88	8,53
S-6254	≥ 114,51	≥ 355,61	≥ 107,59	≥ 111,33	9,13

TET: Tetraciclina; CHL: Cloranfenicol; AMP: Ampicil·lina; AMX: Amoxicil·lina; LEX: Cefalexina.

TET R: ≥10,81 AMP R: ≥23,53 LEX R: ≥25,52
 CHL R: ≥24,86 AMX R: ≥18,54

Altres soques:

LT2 (TET: 5,27; CHL: 13,68; AMP: 8,14; AMX: 1,52; LEX: 10,39)
 S-5712 (TET: ≥114,51; CHL: ≥355,61; AMP: ≥107,59; AMX: ≥111,33; LEX: 5,06)
 S-5978 (TET: 33,65; CHL: 3,20; AMP: 3,77; AMX: 1,07; LEX: 11,31)

Taula 4.37. Distribució de les soques de *S. typhimurium* NaI^R segons el patró de resistència a diferents antimicrobians.

Categoria	Resistència	No. de soques	%
A	- *	1	1,64
B	TET	12	19,67
C	AMP, AMX	4	6,56
D	TET, CHL	3	4,92
K	TET, CHL, AMP, AMX	41	67,21

(**TET**: tetraciclina, **CHL**: cloranfenicol, **AMP**: ampicil·lina, **AMX**: amoxicil·lina)

Quan en el grup de soques de *S. typhimurium* s'analitza la resistència a aquests altres antimicrobians segons el tipus d'animal a partir del qual van ser aïllades i l'any d'aïllament (Taula 4.38) s'observa que les soques procedents d'au són majoritàriament resistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina i amoxicil·lina (K) i corresponen preferentment a aïllats de l'any 1994. En canvi, les de conill majoritàriament són resistents només a tetraciclina (B) i corresponen bàsicament a aïllats de l'any 1997, i totes les de porc i tortuga són multiresistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina i amoxicil·lina (K), sent aïllades preferentment l'any 1997 i 1994, respectivament.

Taula 4.38. Distribució de les soques de *S. typhimurium* Nal^R segons la seva procedència, l'any d'aïllament i el patró de resistència a diferents antimicrobians.

	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	
	Nº Cat.	Nº Cat.	Nº Cat.	Nº Cat.	Nº Cat.	Nº Cat.	Nº Cat.	TOTAL
Au			1 B 6 K	1 C		3 C	1 K	
(Total)	(0)	(0)	(7)	(1)	(0)	(3)	(1)	12
Boví						3 D 3 K		
(Total)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	6
Conill						1 A 9 B 1 K	1 B 1 K	
(Total)	(0)	(0)	(0)	(2)	(1)	(11)	(2)	16
Oví							1 B	
(Total)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	2
Porc						18 K	1 K	
(Total)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(18)	(1)	19
Tortuga	1 K		5 K					
(Total)	(1)	(0)	(5)	(0)	(0)	(0)	(0)	6
TOTAL	1	1	12	3	1	38	5	61

Pel que fa a la presència de resistència a altres antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones entre les soques que pertanyen a cada grup mutacional (Taula 4.39) s'ha de destacar que d'entre les dues soques del Grup I que no presenten cap mutació i són sensibles a les quinolones, l'aïllada de conill (S-5978) és només resistent a la tetraciclina mentre que la de porc (S-5712) ho és també al cloranfenicol, l'ampicil·lina i l'amoxicil·lina. La soca de col·lecció LT2 no presenta cap resistència. Les

altres dues soques del mateix grup resistents a l'àcid nalidíxic, tant la sensible a les tres fluoroquinolones com la resistent, són també multiresistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina i amoxicil·lina. És de remarcar que tots els mutants Ser83 → Tyr i la major part dels Asp87 → Asn són també resistents a aquests antimicrobians, mentre que un 67% dels Ser83 → Phe són resistents només a dos i un 65% dels Asp87 → Gly ho són només a tetraciclina.

Taula 4.39. Distribució de les soques de *S. typhimurium* segons les mutacions que presenten i la resistència a diferents antimicrobians.

Grup	Canvi d'aminoàcid	No. de resistències	No. de soques	%
I	-	0	1	20,00
		1	1	20,00
		4	3	60,00
II	Ser83 → Tyr	4	14	100,00
		1	1	16,67
		2	4	66,67
		4	1	16,67
III	Asp87 → Asn	2	1	4,55
		4	21	95,45
	Asp87 → Gly	0	1	5,88
		1	11	64,71
		2	2	11,76
		4	3	17,65

No. de resistències Categories

0	A
1	B
2	C, D
4	K

4.12. RELACIÓ ENTRE ELS DENDOGRAMES I ELS GRUPS MUTACIONALS

Un cop classificades les soques de *S. typhimurium* segons la mutació que presenten i tenint en compte també la seva resistència a altres antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones, s'ha procedit a estudiar la possible relació entre aquests dos paràmetres i les agrupacions que s'obtenen en funció de les CB. Així, s'han construït els dendogrames de similituds relatives (SR), però afegint, a més a més, les dades corresponents el grup mutacional (segons la taula 4.34) i la seva resistència a altres antimicrobians (segons la taula 4.37). Així, per exemple, la soca denominada "S-5720_97 [Conill] IIb B" és una soca aïllada de conill ([Conill]) l'any 1997 (_97), a la que es va assignar el codi S-5720, que presenta una mutació en el codó 83 del gen *gyrA* (concretament la mutació Ser83 → Phe) i és resistent a tetraciclina (B). En aquests dendogrames el fet que les soques s'assenyalin amb el mateix color indica que pertanyen al mateix grup mutacional.

El dendograma general obtingut per a totes les soques de *S. typhimurium* es mostra a la figura 4.16. En ell s'observa clarament com les soques s'agrupen bàsicament per la mutació concreta que presenten en el gen *gyrA* i, en molts casos, presenten les mateixes característiques pel que fa a la procedència, any d'aïllament i patró de resistència a antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones.

Per tal d'observar si l'agrupació de les soques de *S. typhimurium* es manté també quan s'estudien aquestes soques per separat segons el tipus d'animal a partir del que van ser aïllades o segons l'any d'aïllament, s'han construït diferents dendogrames. A la figura 4.17 es mostren els dendogrames obtinguts per a les soques de *S. typhimurium* separades segons el tipus d'animal a partir del qual s'aïllaren. En ells s'observa molt bé com pràcticament totes les soques incloses dins un mateix grup presenten la mateixa mutació en el gen *gyrA* i moltes d'elles són resistents als mateixos antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones.

De la mateixa manera, a la figura 4.18 es mostren, per separat, els dendogrames obtinguts per a les soques *S. typhimurium* aïllades els anys 1994 i 1997. Totes les soques aïllades l'any 1994, a excepció d'una, estan molt relacionades entre elles, amb un valor de SR superior al 96%, independentment de que vinguin d'au o de tortuga. Totes aquestes soques presenten la mutació Ser83 → Tyr i són resistents a tetraciclina, cloranfenicol, ampicil·lina i amoxicil·lina (K). Entre les soques aïllades l'any 1997 s'observa també la formació de grups de soques, bàsicament del mateix origen, que presenten el mateix tipus de mutació i, en molts casos, són resistents a la mateixa combinació d'antimicrobians no relacionats estructuralment amb les quinolones.

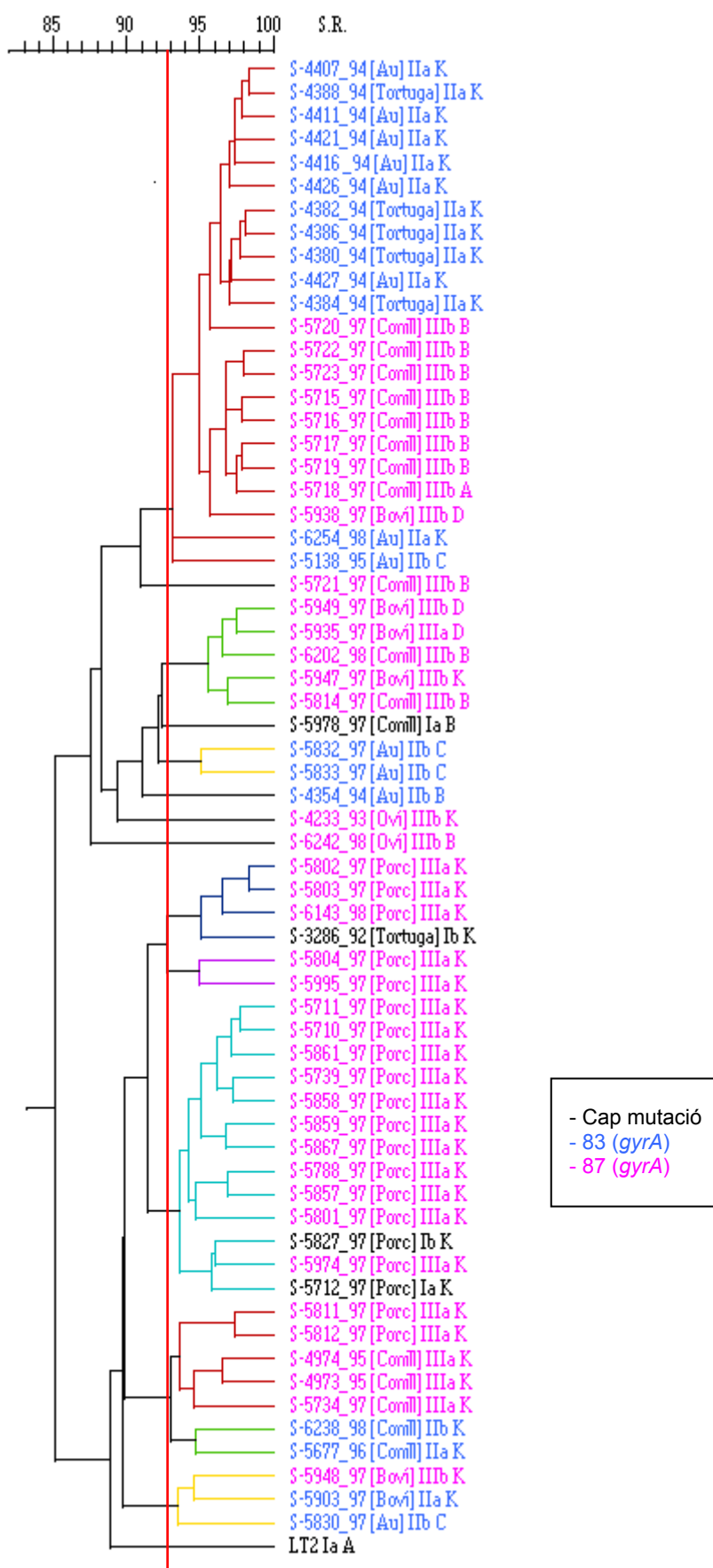


Figura 4.16. Dendrograma de similituds relatives i grups mutacionals per a les soques de *S. typhimurium*.

Figura 4.17. Dendrogrames de similituds relatives i grups mutacionals de les soques de *S. typhimurium*, segons el tipus d'animal.

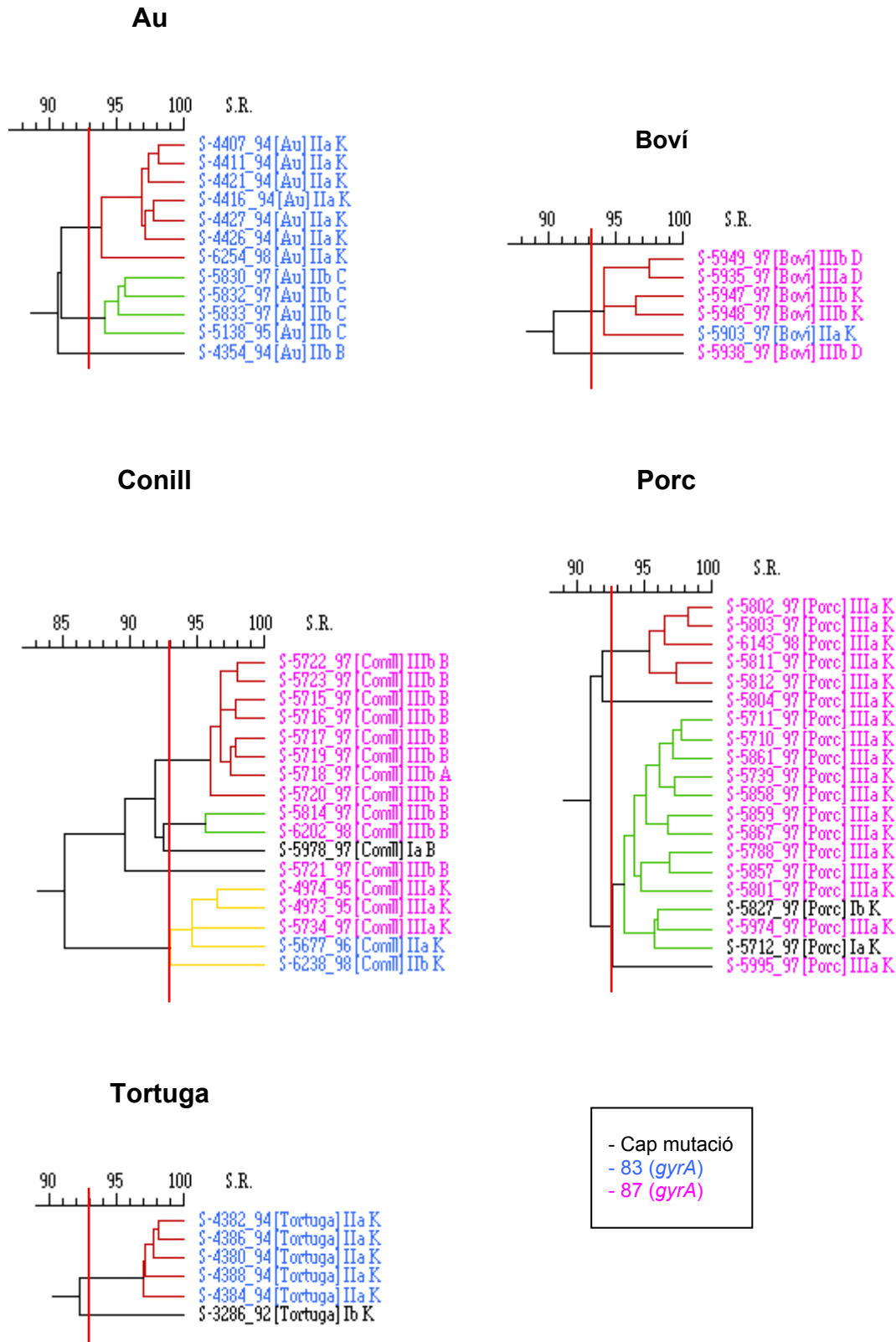


Figura 4.18. Dendogrames de similituds relatives i grups mutacionals de les soques de *S. typhimurium*, segons l'any d'aïllament.

