



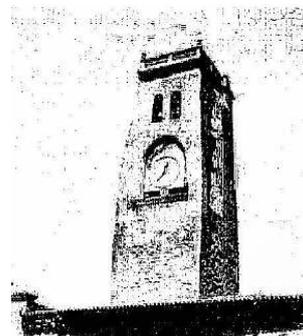
**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Genètica i de Microbiologia**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS Y DE  
PLÁSMIDOS DE *Enterobacteriaceae*  
PORTADORES DE  $\beta$ -LACTAMASAS  
DE ESPECTRO EXTENDIDO**

Vanessa Blanc Pociello

2007



**A mis padres**

*“Mis amigos lo vislumbraron una vez. Estaba en el aliento que hacia volar a un centenar de escarabajos esmeralda. Estaba en los ecos que seguían a cada golpe de tambor. No puedo decir nada más, porque ha de seguir siendo un misterio, uno que no termina nunca”.*  
Amy Tan

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.* Marie Curie

## AGRADECIMIENTOS

---

Tengo tanto que agradecer que no se por donde empezar, quizás por el principio sea una buena idea.

Agradezco la oportunidad que me dio el Dr. Jordi Barbé de conocer la unidad de Microbiología Molecular hace ya cuatro años. En ella he aprendido muchísimas cosas y he conocido a mucha gente que ha contribuido de una forma u otra a mi trabajo, a mi formación y a mi vida en general.

A la doctora Montserrat Llagostera le doy las gracias por haber confiado en mí, por la dedicación a mi trabajo, por aportar puntos de vista diferentes de las cosas, por todas las explicaciones, las correcciones y las críticas constructivas hechas en este trabajo.

A mi otra directora de tesis le debo mi agradecimiento más profundo, por la infinidad de consejos profesionales y personales que me ha prestado, por enseñarme a trabajar tan minuciosamente, por ser tan profesional, por tener tanta paciencia conmigo, por apoyarme siempre y por ser mi amiga, gracias Pilar.

También debo agradecer el trabajo hecho por todos los integrantes del proyecto coordinado en que se engloba esta tesis doctoral, la gente de los Serveis de Microbiologia de Sant Pau y de Vall d'Hebron y del Laboratori de sanitat animal del DARP de la Generalitat de Catalunya. Además un agradecimiento especial al Laboratorio de referencia de *E. coli* de España en Lugo por serotipar algunas de las cepas estudiadas.

Pero lo mejor de este lugar han sido todos los compañeros del día a día. Mentes brillantes, personas cargadas de humanidad, de las que he aprendido mucho y que nunca olvidaré.

A Joan, tu eres el mejor anfitrión que puede tener este laboratorio. Por integrarme en esta familia desde el primer día y por todo el trabajo que desempeñas y que nos facilita enormemente el nuestro.

A Isabel por todos los medios y soluciones preparados "sin previsión" y que tanto me han ayudado en mi trabajo, por aportar ese toque de naturalidad al laboratorio, por todas las conversaciones, por Sara Varas y por haberte convertido en una amiga.

A M<sup>a</sup> Elena. Yo de mayor quiero ser como tú. Vas a ser una mama genial porque eres una persona genial. Gracias por saber de todo y ayudarme tanto.

A Sus por su sentido práctico de las cosas, por la tranquilidad que transmites, por las cenas que organizas y por tu amor a los animales.

A Anna, por su espontaneidad, por hacerme reír, por las charlas y por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Jesús, uff!!! Bueno, por las risas, por los mosqueos, por las meriendas, por escribir las tesis hasta las tantas, por las caravanas que te has tragado por llevarme a Cerdanyola, en fin... Por ser como eres.

A Gerard, que majo que eres!!! Reservado pero sorprendente. Gracias por tu lógica aplastante y por tener siempre una frase idónea para cada situación.

A la nostra nena, Carlota! La master de los bacteriófagos! Por ser tan espontánea y no perder nunca el buen humor.

A Marc por su serenidad y saber estar en todas las situaciones.

A Susana por todos sus conocimientos y por la ayuda prestada.

A Laura y a Neus por aportar juventud y aire fresco al laboratorio.

Gracias también a todos los que ya no estáis en el lab, a Anna, a Núria, a Jordi, a Gerard, a Mónica y muy especialmente a Montse y a Mirle por ayudarme en los comienzos y a Noelia, tu eres todo dulzura.

Fuera del ámbito laboral y científico tengo que agradecer el apoyo que he recibido de todos mis amigos de aquí y de allí y de mi nueva familia catalana. Gracias muy especialmente a Elisa y a Juan, por portarse tan bien conmigo, y a la niña de mis ojos!!! a Berta, por ser tan lista y quererme tanto.

Hay una persona que ha sido especialmente importante durante estos cuatro años y espero que lo siga siendo durante toda mi vida. A ella le doy las gracias por escucharme, por apoyarme, por interesarse por mi trabajo, por ayudarme en todo (especialmente con las dudas de informática), por hacer las cosas más fáciles, por quererme sin reservas y por dejarse querer por mí. Gracias Jordi.

Sin embargo, todo el trabajo hecho y todo lo que soy se lo debo a las personas que más han confiado en mí, de las que más apoyo he recibido y que me han transmitido un fuerte sentimiento de responsabilidad y conciencia, mis padres. Cuantas veces habré oído "*Estudia i no teu caldrà fé*" Pues sí, he estudiado con todo mi esfuerzo y corazón. Sólo espero que algún día se sientan tan orgullosos de mí como yo de ellos.

A todos, GRACIAS, GRÀCIES.

## GLOSARIO

---

μg	Microgramo
μl	Microlitro
AMP	Ampicilina
AZ	Azida sódica
BLEE	β-lactamasa de espectro extendido
cfu	Unidad formadora de colonia
CGSC	<i>The Coli Genetic Stock Center</i>
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM	Cloranfenicol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> patógena extraintestinal
FZD	Furazolidona
GEN	Gentamicina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
ICP	Plásmidos que contienen iterones
In	Integrón
IS	Secuencia de inserción
KAN	Kanamicina
Kb	Kilobase
LPS	Lipopolisacárido
MDa	Megadalton
mg	Miligramo
ml	Mililitro
NAG	N-acetilglucosamina
NAL	Ácido nalidíxico
NAM	N-acetilmurámico
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
NT	Nitrofurantoína
orf	<i>Open reading frame</i>
PAI	Isla de patogenicidad
pb	Par de bases

PBP	Proteínas de unión a la penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
pfu	Unidad formadora de calva
RBS	Lugar de unión de los ribosomas
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
STR	Estreptomina
SUL	Sulfonamida
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TET	Tetraciclina
TMP	Trimetoprim
TOB	Tobramicina

***RESUMEN***

---

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos, y en particular la producción de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido (BLEE), es un grave problema descrito principalmente en cepas de origen clínico. Sin embargo, no existen muchos datos sobre la prevalencia y la capacidad de difusión de estas resistencias en otros ambientes. Por ello, los objetivos de esta Tesis se enmarcan en un amplio proyecto coordinado cuya finalidad ha sido el estudio de la prevalencia de BLEE, cefamicinasas y carbapenemasas en diversos ambientes, determinar la transmisibilidad de estas resistencias y, finalmente, identificar y caracterizar los plásmidos que las codifican.

En este trabajo, en primer lugar se han estudiado 107 cepas procedentes de granjas de aves, de cerdos y de conejos, siendo todas ellas *Escherichia coli*, a excepción de una cepa de *Enterobacter cloacae*. No se ha encontrado ninguna cepa portadora de la resistencia a carbapenémicos, aunque si se describe la presencia de la  $\beta$ -lactamasa plasmídica CMY-2 y de una gran diversidad de enzimas BLEE. Además, el 93% de las cepas fueron resistentes a dos o más de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos probados. En las granjas de aves, la enzima CTX-M-14 y la cefamicinasa CMY-2 han sido las más frecuentes. Por el contrario, en las de cerdos la enzima CTX-M-1 ha sido la más prevalente. Se describe, por primera vez, la presencia de las enzimas TEM-52 y SHV-2 en las granjas de aves, la enzima SHV-5 en las de cerdos y la enzima CMY-2 en las de conejos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las granjas de animales actúan como un reservorio de genes de BLEE y CMY-2. Asimismo, se ha determinado el grupo filogenético y el estatus ExPEC de las 106 cepas de *E. coli* aisladas de granjas de animales. La mayoría de las cepas han sido definidas como comensales al pertenecer a los filogrupos A y B1. Aunque una proporción significativa de cepas procedentes de granjas de aves pertenece a los filogrupos B2 y D, ambos vinculados a cepas patógenas. Por el contrario, en granjas de cerdos las cepas mayoritarias han sido las pertenecientes al filogrupo A. Del total de las cepas estudiadas, sólo 10 se han caracterizado como ExPEC, presentando éstas una media de nueve factores implicados en la virulencia. La gran mayoría de estas cepas proceden de granjas de aves, pertenecen al filogrupo D y codifican la enzima CMY-2. Además, cabe enfatizar el hecho no descrito hasta el momento, de que dos de las tres cepas aisladas de conejos han sido caracterizadas como ExPEC.

En segundo lugar, se han seleccionado 111 cepas de enterobacterias, aisladas de granjas de animales, de alimentos, de muestras clínicas, de muestras fecales de portadores

sanos, de brotes alimentarios y de aguas residuales y se ha estudiado la transmisibilidad de las BLEE y CMY-2. Más del 70% de dichas cepas transfirieron por conjugación estas resistencias. Además, un 29,2% de las cepas transconjugantes obtenidas presentaron resistencias a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos. Por otra parte, las enzimas CTX-M-1, CTX-M-32, CTX-M-14a, familia SHV y CMY-2 fueron las que se transfirieron con una mayor frecuencia.

Finalmente, se han caracterizado los plásmidos conjugativos, presentes en las 111 cepas que codificaban BLEE y CMY-2. Para ello, se ha determinado su peso molecular mediante electroforesis en campo pulsante, y se ha identificado el grupo de incompatibilidad al cual pertenecen. Esta identificación se ha llevado a cabo mediante hibridación con sondas frías por *dot blot* y *Southern blot* y por PCR y secuenciación. Los resultados obtenidos indican que hay una clara concordancia entre los plásmidos que, aún procediendo de diversos ambientes, presentan características muy similares como son la enzima que codifican, el grupo de incompatibilidad al que pertenecen y, en ciertos casos su tamaño. Así, la extensa mayoría de los plásmidos que codifican de la enzima CTX-M-14a, pertenece al grupo IncK. De igual forma, las enzimas del grupo CTX-M-1 se han localizado en plásmidos IncN. La enzima CMY-2 se ha transferido en plásmidos de alto peso molecular portadores de dos replicones, IncQ e IncA/C<sub>2</sub>. En cambio, la enzima CTX-M-9 se ha vehiculizado en plásmidos con grupos Inc muy variados, aunque cabe destacar el hecho de que tres de ellos pertenecen al IncHI2.

***ÍNDICE***

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	<b>3</b>
1.2 Filogenia y virulencia de <i>E. coli</i> .....	<b>6</b>
1.3 Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	<b>16</b>
1.3.1 Mecanismos de resistencia a los $\beta$ -lactámicos.....	<b>23</b>
1.4 $\beta$ -lactamasas.....	<b>25</b>
1.4.1 Clasificación.....	<b>26</b>
1.4.2 Distribución.....	<b>29</b>
1.4.3 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	<b>31</b>
1.5 Los plásmidos y el control de su replicación.....	<b>34</b>
1.5.1 Funciones plasmídicas causantes de la incompatibilidad y sus mecanismos.....	<b>36</b>
1.5.2 Caracterización del grupo de incompatibilidad.....	<b>50</b>
1.6 OBJETIVOS.....	<b>54</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
2.1 Muestreo y aislamiento de enterobacterias portadoras de $\beta$ -lactamasas.....	<b>59</b>
2.2 Cepas bacterianas, bacteriófagos y plásmidos.....	<b>60</b>
2.3 Métodos de recuento y obtención de lisados fágicos.....	<b>62</b>
2.4 Serotipado.....	<b>63</b>
2.5 Métodos genéticos.....	<b>63</b>
2.5.1 Transformación por electroporación.....	<b>63</b>
2.5.1.1 Inducción de la competencia en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	<b>63</b>
2.5.2 Conjugación en medio sólido.....	<b>64</b>
2.6 Métodos de DNA.....	<b>66</b>
2.6.1 Extracción de DNA.....	<b>66</b>
2.6.1.1 Extracción de DNA total desde colonia.....	<b>66</b>
2.6.1.2 Extracción de DNA cromosómico desde cultivo líquido.....	<b>66</b>
2.6.1.3 Extracción de DNA fágico.....	<b>67</b>
2.6.1.4 Miniextracción de DNA plasmídico.....	<b>68</b>
2.6.1.5 Extracción de DNA plasmídico.....	<b>69</b>
2.6.1.6 Extracción de DNA para PFGE.....	<b>69</b>
2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	<b>71</b>

2.6.3	Digestión de DNA.....	75
2.6.4	Defosforilación del extremo 5' del DNA.....	76
2.6.5	Ligación de DNA.....	77
2.6.6	Electroforesis horizontal de DNA en agarosa.....	78
2.6.7	Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles.....	79
2.6.8	Electroforesis en campo pulsante (PFGE).....	79
2.6.9	Métodos de hibridación.....	81
2.6.9.1	Marcaje colorimétrico de las sondas.....	81
2.6.9.2	Hibridación por <i>dot blot</i> .....	82
2.6.9.3	Hibridación por <i>Southern blot</i> .....	83
2.6.9.4	Deshibridación de las membranas.....	86
2.6.10	Secuenciación.....	86
2.7	Métodos informáticos.....	87
2.8	Métodos estadísticos.....	87
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
3.1	Aislamiento y caracterización de enterobacterias de granjas de aves, de cerdos y de conejos.....	91
3.2	Estudios de filogenia y virulencia.....	99
3.3	Identificación y caracterización de los plásmidos portadores de BLEE y de $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C.....	105
3.3.1	Estudios de transmisibilidad.....	105
3.3.2	Caracterización del tamaño y del grupo de incompatibilidad de los plásmidos conjugativos portadores de BLEE y de CMY-2.....	109
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>129</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>161</b>

#### **Anexo I.**

Medios, antibióticos y aminoácidos y soluciones.

#### **Anexo II.**

**Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., Navarro, F., Cortés P. y Llagostera, M.** (2006) ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet. Microbiol.* 118:299-304.

#### **Anexo III.**

**Blanc, V., Cortés, P., Mesa, R. J., Miró, E., Navarro, F. y Llagostera, M.** (2007) Characterization of plasmids encoding ESBL and CMY-2 in *E. coli* isolated from animal farms. *Int. J. Ant. Agents.* En prensa.

#### **Anexo IV.**

**Blanc, V., Cortés, P., Blanco, J. E. y Llagostera, M.** (2007) Phylogenetic origin and virulence-associated factors of ESBL- and CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from animal farms. Enviado para su publicación.

## ***1. INTRODUCCIÓN***

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* agrupa a un número creciente de bacterias englobadas en 47 géneros, y a todo un conjunto de enterobacterias no clasificadas con un elevado grado de homología estructural y fisiológica ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)).

Muchos miembros de esta familia forman parte de la microbiota comensal estable o transitoria del tracto intestinal de los humanos y de los animales, aunque también pueden colonizar otros nichos ecológicos como el agua, el suelo o ser parásitos de vegetales (Madigan *et al.*, 2003). Fisiológicamente, se caracterizan por ser bacilos gramnegativos con un tamaño comprendido entre las 4-5  $\mu\text{m}$  de longitud, no esporulados, anaerobios facultativos y con una movilidad flagelar peritrica, a excepción de los géneros *Shigella* y *Klebsiella*. Desde un punto de vista metabólico, destaca su capacidad de fermentar la glucosa, generando diferentes productos finales en función de la especie, y de reducir los nitratos a nitritos. Son oxidasa negativos, a excepción del género *Plesiomonas*, y catalasa positivos, a excepción de *Shigella dysenteriae* (Hale y Keusch, 1996).

La identificación de sus miembros se realiza en función de las diferencias metabólicas que presenta cada género, ya que en medio sólido su morfología colonial es muy similar, en forma de cúpula, lisa y amarillenta. Por ello, se han desarrollado un conjunto de medios selectivos y diferenciales que permiten discernir entre los diversos géneros de las enterobacterias. Por ejemplo, la fermentación de la lactosa que es una característica típica de las bacterias comensales del intestino humano y atípica de las bacterias patógenas como *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia* spp.

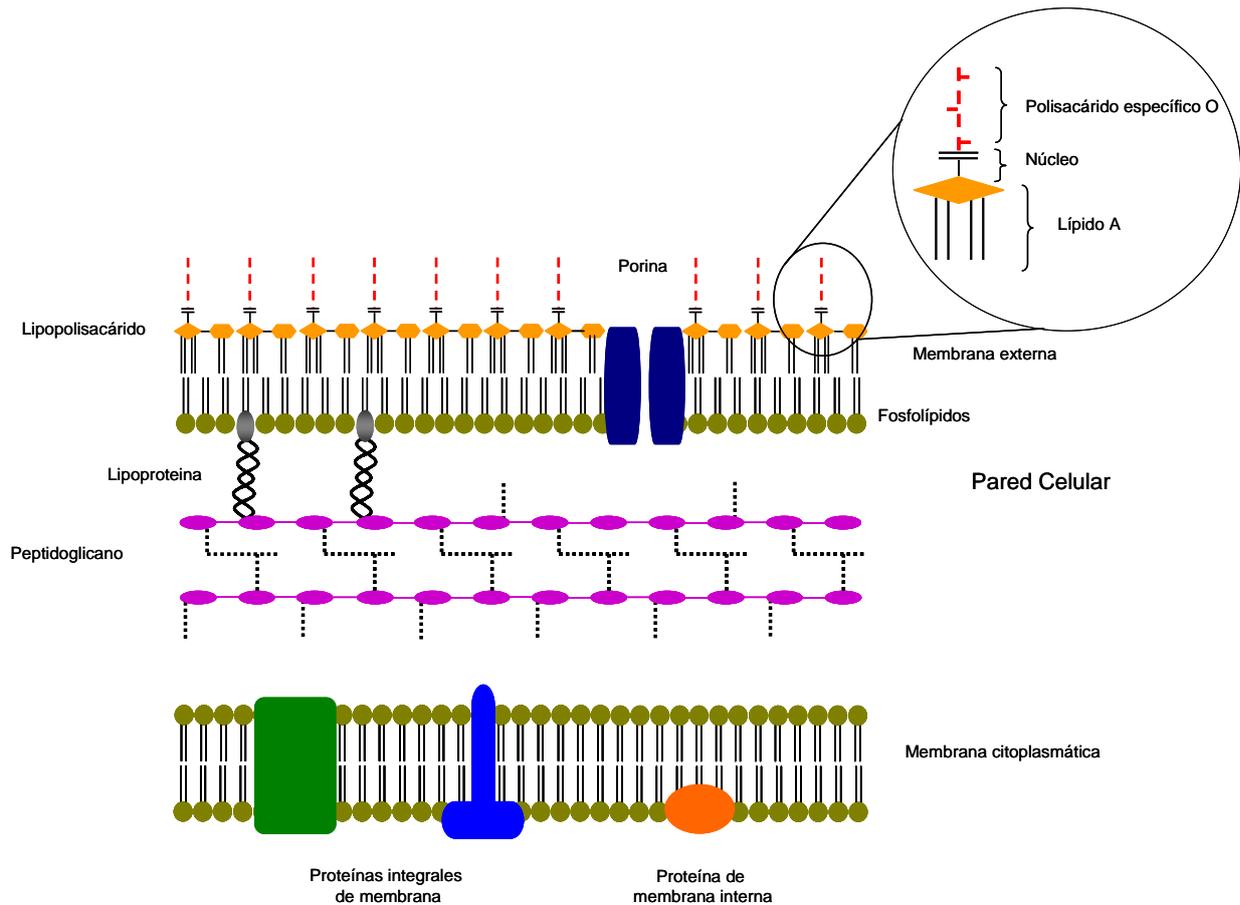
La pared celular de las enterobacterias está formada por una bicapa lipídica, conocida como membrana externa, que contiene proteínas, tales como las porinas, formadoras de canales que permiten el paso de moléculas hidrofílicas no mayores de 1.000 daltons (Da). Se localizan también en esta membrana externa los fosfolípidos y el lipopolisacárido (LPS), cuya región más interna, conocida como lípido A, es una endotoxina formada por ácidos grasos insaturados (Figura 1.1). Dicha región es la principal responsable de la

menor fluidez de la membrana externa y de la poca permeabilidad a muchas moléculas hidrofílicas, incluyendo a muchos antibióticos. La región de polisacáridos del LPS la forman el núcleo o *core* al cual se ancla la región más distal, denominada polisacárido específico O, cuya especificidad viene determinada por una secuencia repetitiva de azúcares, a menudo ramificados. Las variaciones en las ramificaciones constituyen el antígeno somático O. Esta porción condiciona la virulencia de las bacterias gramnegativas patógenas, por lo que debe ser esencial en la interacción hospedador-huésped. Además, en la parte interna de la membrana externa se localiza un complejo denominado lipoproteína, con funciones de anclaje entre la membrana externa y el péptidoglicano.

El péptidoglicano es otro componente importante de la pared celular y se encuentra inmerso en un compartimento llamado espacio periplásmico, comprendido entre la membrana citoplásmica y la membrana externa. Está constituido por una o varias monocapas formadas por repeticiones de una unidad disacárida, N-acetilglucosamina (NAG) unidas, por un enlace  $\beta$ -1,4, al ácido N-acetilmurámico (NAM). Las uniones cruzadas entre las monocapas refuerzan la estructura, dotándola de una estabilidad química y una resistencia mecánica que, junto con la membrana externa, impide la lisis en medios especialmente hipotónicos y contribuye a mantener la forma celular (Huijbregts *et al.*, 2000).

Además de las características inmunogénicas del antígeno O del LPS, las proteínas formadoras de los flagelos en las cepas móviles (flagelinas) y la cápsula de las cepas que la producen son, entre otros, elementos altamente antigénicos conocidos como el antígeno H y el antígeno K, respectivamente. La determinación de estos tres tipos de antígenos es un método de clasificación serotípica muy importante.

A pesar de ser consideradas en su mayoría como bacterias comensales del tracto intestinal de humanos y de animales, ciertos géneros de enterobacterias tienen una gran relevancia clínica. Algunos actúan como patógenos oportunistas, causando infecciones secundarias en los tractos respiratorio y urinario y en el sistema circulatorio. Otros son serios patógenos, destacando los géneros *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. y ciertas cepas de *Escherichia coli* que han tenido que ser clasificadas en función del cuadro de afectación.



**Figura 1.1.** Representación esquemática de las envolturas de *Escherichia coli*.

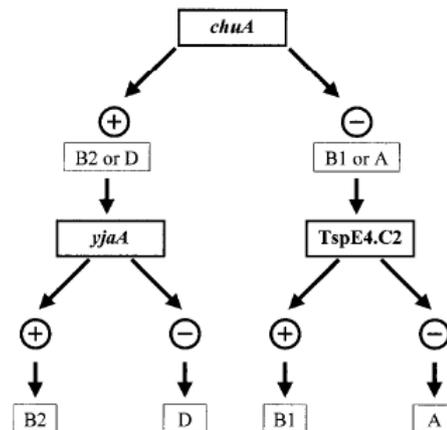
Desde su descubrimiento, los antibióticos han sido el tratamiento más eficaz contra las infecciones causadas por las enterobacterias tanto patógenas como oportunistas. Su utilización masiva ha generado una fuerte presión selectiva que ha conducido, desde la década de los 40, a la selección de bacterias resistentes a toda clase de antibacterianos naturales y sintéticos. El gran problema clínico que esto supone para el tratamiento de estas infecciones en los humanos es también aplicable a los animales de granja. La selección de cepas multirresistentes a los antimicrobianos es un problema creciente debido a la práctica, todavía en uso en ciertos países, de administrar antibacterianos a concentraciones subterapéuticas, mezclados con los alimentos a modo de profilaxis o como promotores de crecimiento sin prescripción veterinaria (Guardabassi y Courvalin, 2006).

## 1.2 Filogenia y virulencia de *E. coli*

La bacteria *E. coli* fue descrita por primera vez en el siglo XIX por el Dr. Theodor Escherich como un microorganismo habitual en la microbiota del intestino de los individuos sanos (Kaper, 2005). Sin embargo, tanto su descubridor como posteriores investigadores demostraron que “*Bacterium coli comune*”, tal como fue denominada inicialmente, podía encontrarse también asociada a infecciones intestinales y extraintestinales.

Herzer y colaboradores desarrollaron en 1990 un sistema de clasificación basado en el análisis de los patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas metabólicas de la estructura poblacional de una colección de 72 cepas de referencia de *E. coli* (<http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Whittam/Lab/ecor/>) de muy diversos orígenes (Ochman y Selander, 1984). Los análisis filogenéticos de esta colección revelaron 4 grupos filogenéticos principales, designados como A, B1, B2 y D (Herzer *et al.*, 1990).

Estudios de bibliotecas genómicas realizados en cepas pertenecientes a los diferentes grupos filogenéticos pusieron en evidencia genes y/o fragmentos de DNA específicos de cada grupo, sugiriéndose así, su uso como marcadores moleculares de cada uno de los grupos filogenéticos existentes. Es en base a estos estudios, que en el año 2000 Clermont y colaboradores desarrollaron una técnica de detección de los grupos filogenéticos de *E. coli*, eligiendo como marcadores filogenéticos específicos los genes *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica), *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K-12, con función desconocida) y un fragmento de DNA con función desconocida, llamado TSPE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000). En la Figura 1.2 se presenta la relación dicotómica que se utiliza para distinguir los cuatro grupos filogenéticos a partir de la identificación de las regiones génicas mencionadas, mediante amplificación de DNA por la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR).



**Figura 1.2.** Árbol dicotómico interpretativo de los diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* en función de la presencia o ausencia de los genes *chuA*, *yjaA* y del fragmento TSPE4.C2. Tomado de Clermont *et al.*, (2000).

Por otra parte, y en función de su patogenicidad, entre las cepas de *E. coli* pueden distinguirse los siguientes grupos.

### **i. *E. coli* comensal**

Las cepas de *E. coli* comensales constituyen gran parte de la microbiota del intestino de humanos sanos, mamíferos y aves. Son cepas perfectamente adaptadas a la coexistencia con su hospedador, raramente son patógenas y no desarrollan sintomatología en dicho hospedador, excepto en casos de inmunodepresión. Típicamente pertenecen a los grupos filogenéticos A y B1 y se caracterizan por carecer de muchos de los determinantes de virulencia que están presentes en cepas patógenas (Russo y Johnson, 2000).

### **ii. *E. coli* patógena intestinal**

Las cepas patógenas de *E. coli* causan infecciones intestinales en una gran variedad de hospedadores. La entrada de la bacteria puede ser por vía oral a través de los alimentos y, tras colonizar el intestino, causan la infección. Estas cepas a menudo producen

enterotoxinas. La especificidad de huésped depende del tipo de adhesinas que expresan; por ejemplo, las fimbrias K99 facilitan la adherencia al tracto intestinal de los corderos, terneros y cerdos, mientras que la adherencia al tracto intestinal de los humanos, a menudo está relacionada con las adhesinas CFAI y CFAII (Ron, 2006).

La primera evidencia de que ciertas cepas de *E. coli* podían causar enfermedad se obtuvo al desarrollar los primeros esquemas de serotipado en los años 30 y 40 del siglo pasado y de hecho, modificaciones de dichos esquemas se siguen utilizando todavía. En la actualidad, se han definido seis clases de patotipos de *E. coli* que causan enfermedades intestinales en humanos, si bien cabe destacar que existe una cierta superposición entre ciertos patotipos diarreicos. No obstante, cada patotipo posee una única combinación de determinantes de virulencia que dan lugar a mecanismos de patogenia bien diferenciados. Las cepas patógenas intestinales se incluyen en los grupos filogenéticos A, B1, D o en linajes no clasificados (Russo y Johnson, 2000) y, según la sintomatología que provocan, se han clasificado en los siguientes grupos:

- *E. coli* enterohemorrágica (**EHEC**). Las cepas de este tipo, además de producir histopatología AE (*attaching and effacing*), sintetizan una potente citotoxina (toxina Shiga), que causa diarreas sangrantes y no sangrantes, síndrome hemolítico urémico y un desarrollo fatal de la enfermedad a nivel renal. Estas cepas son portadoras de un plásmido de 60 megadaltons (MDa) que codifica una enterohemolisina (Ehx) y un antígeno fimbrial involucrado en la colonización. La serovariedad más predominante es la O157:H7. Además, se conocen más de 200 serovariedades de *E. coli* productoras de toxina shiga, aún cuando la mayoría de ellas no son patógenas si no contienen otros factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

- *E. coli* enteropatogénica (**EPEC**). Estas cepas están asociadas a la diarrea infantil en países desarrollados. Producen una histopatología característica, mediante una fuerte adherencia (AE) a la membrana de las células epiteliales intestinales. Otras características son la ausencia de la toxina shiga, la presencia del plásmido EAF (*EPEC adherente factor*) que codifica adhesinas tipo BFP (*bunde-forming pilus*), la presencia de fimbrias tipo 1, la producción de una toxina termoestable de bajo peso molecular, llamada EAST1 (*enteroaggregative E. coli heatstable enterotoxin I*), y, en ocasiones, la presencia de una

proteína de membrana externa llamada intimina, codificada en el gen *eae* (Nataro y Kaper, 1998).

- *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**). Es la principal causa de diarrea en turistas de países desarrollados y en recién nacidos. No produce cambios histológicos aparentes más que una ligera inflamación que suele ir acompañada de náuseas. Estas cepas son productoras de toxinas termoestables (STa y b) y/o termosensibles (LT-I y II), además de una variedad de factores de colonización intestinal.

- *E. coli* enteroinvasiva (**EIEC**). Este grupo engloba también varias especies de *Shigella* como *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. dysenteriae*. Se caracterizan por causar diarrea y disentería, gracias a un complicado mecanismo de patogenia que comienza con la invasión de células epiteliales y su posterior expansión a sus adyacentes, provocando una fuerte reacción de inflamación y ulceración.

- *E. coli* enteroagregativa (**EAEC**). Se caracteriza por su patrón de agregación y adherencia a las células epiteliales y por la producción de la toxina EAST-1. Este patotipo es causante de diarreas persistentes en niños y adultos, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, y es responsable de episodios epidémicos en varios países.

- *E. coli* *diffusely adherent* (**DAEC**). Estas cepas se caracterizan por su patrón de adherencia difusa en cultivos de células epiteliales, lo cual se debe principalmente a la familia de adhesinas Afa/Dr. Estas bacterias son capaces de activar la señal de cascadas de transducción en células epiteliales, lo cual puede dañar la funcionalidad de las enzimas localizadas en las microvellosidades. Son causantes de diarreas en niños de entre 1 y 5 años.

Ciertos patotipos no son exclusivos de humanos, sino que pueden encontrarse también en animales. Así, las cepas ETEC son responsables de diarrea en varias especies animales, mientras que las EHEC pueden infectar, asintóticamente, a varias especies animales, por lo que éstas son reservorio de este tipo de cepas (Nataro y Kaper, 1998).

### iii. *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC)

Determinadas cepas de *E. coli* pueden causar importantes infecciones extraintestinales en zonas anatómicas concretas o bien en órganos localizados, causando morbilidad y costes para la sanidad. Sin embargo, este tipo de infecciones no suele estar en el punto de mira de los sistemas sanitarios debido a que no acostumbran a estar asociadas a grandes epidemias y no suelen derivar de toxiinfecciones alimentarias. Las cepas causantes de este tipo de infecciones son epidemiológica y filogenéticamente diferentes de las comensales y parecen ser incapaces de causar infecciones intestinales. No obstante, sí son capaces de instaurarse de forma estable en el intestino del hospedador, siendo en algunos casos de colonización más exitosa que la propia microbiota fecal comensal (Johnson y Russo, 2002), representando un 20% del total en humanos sanos.

Dada la creciente importancia de este tipo de cepas, en el año 2000, Russo y Johnson proponen como designación para estas cepas, el acrónimo “ExPEC” (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*). La necesidad de esta nueva denominación la justifican, ambos autores, por la existencia de gran cantidad de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, portadoras de diferentes perfiles de virulencia, lo cual imposibilita su clasificación en un tipo concreto de síndrome. Un aislado clínico se define como ExPEC si posee factores de virulencia reconocidos como extraintestinales o bien si ha demostrado su capacidad virulenta en un modelo animal. El aislamiento de una cepa de *E. coli* de un paciente con una infección extraintestinal no determina que dicha cepa sea ExPEC, ya que cualquier cepa comensal de *E. coli* puede causar infección extraintestinal si el huésped está inmunológicamente comprometido. Designaciones más restrictivas son utilizadas para patotipos causantes de síndromes específicos: a) UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*), principal causante de las infecciones en el tracto urinario, la cual presenta múltiples adhesinas y toxinas específicas de este patotipo. Respecto a este tipo de cepas, varios estudios apuntan a que existe una relación entre la pérdida de factores de virulencia y la resistencia a las quinolonas y a las fluoroquinolonas (Vila *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2006) y b) BMEC (*Bacterial Meningitis Escherichia coli*) principal agente de meningitis en recién nacidos. Este patotipo puede atravesar la barrera hematoencefálica, provocando un proceso de inflamación de las meninges. La mayoría de las cepas ExPEC son patógenos oportunistas que infectan en estadios posteriores al estrés, siendo el lugar de la infección no necesariamente el de la colonización.

Para la identificación de las cepas ExPEC, se seleccionaron cinco marcadores de virulencia (*papC* o *papAH*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II*), mediante el análisis estadístico de los resultados del tipado de virulencia en tres colecciones de cepas. La identificación de ExPEC en estas colecciones se basó tanto en estudios epidemiológicos de infecciones urinarias sintomáticas y fecales, como en estudios de virulencia intestinal en animales. La presencia de más de dos de los cinco marcadores estudiados fue el criterio de discriminación entre ExPEC y no-ExPEC considerado en las tres colecciones (Johnson *et al.*, 2003a).

Numerosos estudios demuestran que las cepas ExPEC pertenecen a los grupos filogenéticos B2 y también, aunque en menor medida, al grupo D (Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003a). Cabe destacar que ciertos clones ExPEC presentan también serotipos característicos O:K:H. Los factores de virulencia típicos de ExPEC incluyen diversas adhesinas, lipopolisacáridos capsulares, toxinas, sideróforos, proteasas, invasinas, proteínas de resistencia al suero que pueden afectar a una gran variabilidad de procesos celulares, incluyendo la síntesis de proteínas, transductores de señales, funciones del citoesqueleto, división celular, captación de hierro, transcripción, apoptosis y funciones mitocondriales (Kaper *et al.*, 2004). Estos factores, que diferencian a las cepas patógenas de las no patógenas, están frecuentemente localizados en plásmidos, transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad (*PAIs: pathogenicity-associated islands*). Ciertas cepas pueden llegar a contener, en algunos casos, múltiples islas de patogenicidad, cada una con factores de virulencia que pueden ser diferentes o iguales, lo cual resulta en múltiples copias de un factor de virulencia particular. De igual forma, algunas cepas ExPEC son portadoras de genes de resistencia, tales como  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en elementos móviles como plásmidos (Johnson y Russo, 2002; Branger *et al.*, 2005).

La evolución de las cepas ExPEC sigue estando poco clara. Algunos autores apuntan a que la aparición de estos clones virulentos se debe a la acumulación de factores de virulencia dentro de los filogrupos B2 y D, afirmando que existe una relación entre los factores de virulencia que porta un cepa y el grupo filogenético al cual pertenece (Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001). De esta forma, se señala que las cepas pertenecientes al grupo B2 son muy divergentes frente al resto de grupos e incluyen a la gran mayoría de las cepas involucradas en las infecciones extraintestinales. Se ha propuesto que existe una

compatibilidad especial entre el fondo genético de las cepas B2 y los genes de virulencia, explicando la adquisición de los mismos por mecanismos de transferencia horizontal en períodos de presión selectiva (Picard *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 2000). Esta hipótesis explicaría la concentración selectiva de genes de virulencia en genotipos B2. Se ha sugerido también que una transferencia horizontal de estos mismos factores de virulencia hacia cepas comensales podría convertir a éstas en patógenos potenciales (Johnson y Russo, 2002).

Además de causar enfermedades en humanos, algunas cepas ExPEC pueden generar grandes pérdidas económicas en granjas de engorde y en la industria avícola. El patotipo APEC (*Avian pathogenic Escherichia coli*), englobado dentro de la clasificación ExPEC realizada por Russo y Johnson, causa infecciones extraintestinales tanto en aves de corral como en pollos, patos y otras especies avícolas (Mellata *et al.*, 2003). El proceso infeccioso más común es la colibacilosis que se caracteriza por una infección inicial de las vías respiratorias, concretamente en los sacos alveolares, de pollitos de tres a doce semanas de vida, seguida de una infección generalizada, causante de síndromes como perihepatitis, pericarditis y septicemia. Las aves tienen un primer contacto con las bacterias por vía aérea. Éstas pasan posteriormente a la sangre desde los sacos alveolares, ya que son zonas de fácil colonización, dado que, en principio, están libres de macrófagos. Se ha descrito que las condiciones ambientales y el estrés biológico producido por las infecciones virales o por el micoplasma, sumado a la pobre ventilación de las granjas, predispone a las aves a las infecciones por este patotipo de *E. coli* (Dozois *et al.*, 2000; Mellata *et al.*, 2003).

Las cepas APEC se asocian clásicamente a los serogrupos O2 y O78, los cuales son responsables de un 80% de las infecciones (Ron *et al.*, 2006). Cabe destacar los estudios puntuales realizados en Sudamérica, donde se describe una alta incidencia de APEC pertenecientes a los serogrupos O2 y O8, lo cual debe atribuirse a las diferencias regionales entre los diversos grupos clonales (Dias da Silveira *et al.*, 2002).

No existe un patrón definido de factores de virulencia que pueda ser utilizado como determinante de APEC, sobre todo si se tiene en cuenta que ciertos genes de virulencia se localizan en cepas de *E. coli* causantes de infecciones tanto en humanos como en aves, sugiriéndose que la transmisión tiene lugar desde los alimentos a los humanos (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006a). Sin embargo, existe un conjunto de factores de

virulencia generalmente presentes en cepas APEC, como son: adhesinas específicas, sistemas de adquisición de hierro, resistencia al complemento, toxinas, hemaglutininas, incremento de supervivencia en suero y cápsulas. No obstante, las diferencias significativas en la prevalencia de los genes de virulencia dentro de los aislados APEC, procedentes de diferentes ambientes y hospedadores, hace que algunos autores sugieran la existencia de subgrupos dentro de la denominación APEC (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005). Por otra parte, varios estudios han demostrado una relación entre la virulencia de las cepas APEC y la presencia de plásmidos tipo ColV, de entre 80 kb y 180 kb. Estos plásmidos son portadores de conocidos o hipotéticos genes de virulencia, genes de resistencia a los antimicrobianos, varios operones con función desconocida y una gran variedad de elementos móviles, los cuales facilitarían la transferencia génica entre cromosomas y plásmidos y explicaría el hecho de que ciertas islas de patogenicidad, presentes en el cromosoma de las cepas APEC, tengan secuencias muy similares a los plásmidos ColV (Johnson *et al.*, 2006b). De igual forma, esta transferencia se ha propuesto como mecanismo de dispersión de la virulencia desde las cepas animales APEC a las cepas de *E. coli* causantes de infecciones en humanos (Johnson *et al.*, 2005).

Seguidamente se comentan los factores de virulencia comúnmente identificados en cepas APEC:

### **i. Adhesinas**

Estas proteínas son importantes en la colonización de los tejidos del hospedador ya que median el contacto inicial y la posterior adhesión del patógeno a los receptores de superficie de las células eucariotas. No obstante, no parecen poseer un papel esencial en la virulencia de las cepas APEC. Una clasificación de las mismas distingue entre adhesinas manosa resistentes, donde se incluyen las P-relacionadas (P y F) y P-no relacionadas (familia Dr), y adhesinas manosa sensibles, entre las que se incluyen las fimbrias tipo 1.

Las más importantes se resumen en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Principales adhesinas involucradas en la colonización de los tejidos.

Adhesina	Características principales
<b>Fimbrias P</b>	<p>Proteínas codificadas en el operón <i>pap</i>, que consta de nueve genes (de <i>papA</i> a <i>papI</i>) que dan lugar a la formación de una fibra helicoidal, coronada por una proteína llamada PapG, la cual es la responsable de la especificidad de unión al receptor. Las cepas de <i>E. coli</i> APEC productoras de estas fimbrias colonizan los sacos alveolares, los pulmones y órganos internos. Sin embargo, no se expresan cuando colonizan la tráquea (Mellata <i>et al.</i>, 2003).</p>
<b>Fimbrias tipo 1</b>	<p>Codificadas en un operón integrado por ocho genes (de <i>fimA</i> a <i>fimH</i>). Generalmente se expresan durante la colonización de la tráquea, pulmones y sacos alveolares, pero no tienen ningún papel en la adherencia a tejidos más internos ni tampoco en sangre. Por ello, se ha considerado que estas fimbrias son importantes en los primeros estadios de la infección (Mellata <i>et al.</i>, 2003).</p>
<b>Familia Dr</b>	<p>La familia de las adhesinas manosa resistentes Dr incluye a la hemaglutinina Dr y a las adhesinas no fimbriadas AFAI y AFVIII. Estas últimas están codificadas en varios operones (<i>afa</i>, <i>daa</i> y <i>dra</i>) relacionados entre sí. Se expresan en cepas de <i>E. coli</i> uropatógenas y diarreicas de humanos y de animales, formando estructuras amorfas en la membrana, cuyo receptor son los diferentes epítomos del antígeno Dr (Le Bouguéneq, 2005).</p>
<b>Fibras curli</b>	<p>Las llamadas fibras “<i>curli</i>” se expresan en cepas de <i>Salmonella</i> y de <i>E. coli</i>, tanto comensales como patógenas, incluidas las cepas APEC. Se caracterizan por ser delgadas, irregulares, flexibles y agregables. En <i>E. coli</i>, se requieren dos operones (<i>cgsAB</i> y <i>cgsDEF</i>) y varios genes reguladores de la expresión (<i>crl</i>) para la biosíntesis de estas fibras. Juegan un papel importante en la invasión de las células eucariotas a través de su unión a la fibronectina (Mokady <i>et al.</i>, 2005).</p>

## ii. Sistemas de adquisición de hierro

La adquisición de hierro es esencial en los procesos infectivos de las cepas patógenas de *E. coli*. Por ello, para captar a este elemento, que habitualmente no se halla en forma libre, sino asociado a proteínas, las bacterias han desarrollado dos estrategias diferentes: i) disponer de receptores de los transportadores de hierro como la hemoglobina, la lactoferrina o la transferrina y ii) secretar moléculas de bajo peso molecular, denominadas

sideróforos, capaces de quelar  $\text{Fe}^{+3}$  asociado a proteínas transportadoras. Los sideróforos tienen una alta afinidad por esta forma del hierro, ya que presentan una constante de disociación de entre  $10^{22}$  y  $10^{55}$  y son interiorizados en la bacteria a través de receptores específicos, localizados en la pared celular bacteriana (Neilands, 1995).

Las aerobactinas y las yersiniabactinas, codificadas en plásmidos ColV y en la isla de patogenicidad de *Yersinia* (HPI), respectivamente, son, además de las enterobactinas, dos de los sistemas de captación de hierro más frecuentemente descritos en cepas APEC. En algunos casos, la posesión de múltiples sistemas de captación de hierro facilita la supervivencia de la bacteria en condiciones muy diversas (Mokady *et al.*, 2005).

### **iii. Resistencia al complemento**

La resistencia al complemento del hospedador ha sido frecuentemente detectada en cepas APEC y es considerada como un indicador de virulencia, estando codificada en plásmidos portadores de múltiples factores de virulencia. El operón colV consta de genes de síntesis (*craC*), de inmunidad (*cvi*) y de dos genes de exportación (*cvaA* y *cvaB*) (Gilson *et al.*, 1987).

### **iv. Hemolisinas**

Son proteínas tóxicas secretadas por bacterias hemolíticas que causan infecciones tanto intestinales como extraintestinales. Además de la lisis de los eritrocitos por formación de canales catiónicos en la membrana de los mismos, contribuyen a la inflamación y al daño tisular. Junto a las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , descritas en cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) y en otros aislados causantes de infecciones extraintestinales, una hemolisina codificada por el gen *hlyE* ha sido identificada en un aislado APEC (Reingold *et al.*, 1999).

### **v. Resistencia al suero**

Una de las características más comunes de las cepas APEC es el incremento de la resistencia al suero del huésped (Horne *et al.*, 2000). Pfaff-McDonough y colaboradores identificaron al gen *iss* (*increased serum survival*) como responsable de esta resistencia,

encontrándose dicho gen en la mayoría de los aislados de *E. coli* de aves enfermas y, en mucha menor proporción, en aislados de aves sanas (Pfaff-McDonough *et al.*, 2000).

#### vi. Hemaglutinina

El gen *tsh* (*termosensitive hemaglutinine*) codifica una hemaglutinina sensible a la temperatura perteneciente a la familia de las proteasas autotransportadoras de bacterias gramnegativas y se ha relacionado con diversas funciones de virulencia, como adhesinas, proteasas, citotoxinas y proteínas de invasión celular. El gen fue identificado por primera vez en cepas APEC, pero nunca se ha encontrado en cepas fecales de aves sanas (Dozois *et al.*, 2000).

#### vii. Islas de patogenicidad (PAI)

Las PAIs son bloques de virulencia identificados inicialmente en cepas de *E. coli* patógenas de humanos. Sin embargo, en la actualidad, su presencia no está restringida a un grupo de patógenos concreto, sino que se localiza de igual forma en patógenos humanos, animales y vegetales, tanto gramnegativos como grampositivos (Hacker y Kaper, 2000). Parreira y Gyles describieron en 2003 la primera isla de patogenicidad localizada en el cromosoma de una bacteria *E. coli* APEC, aunque estudios posteriores han descrito nuevas PAIs portadoras de genes descritos como adyuvantes de la virulencia en APEC (Chouikha *et al.*, 2006; Kariyawasam *et al.*, 2006).

### 1.3 Antibióticos $\beta$ -lactámicos

La familia de antibióticos mayoritariamente empleada en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por enterobacterias es la de los  $\beta$ -lactámicos. Cabe destacar que la existencia de metabolitos antagonistas del crecimiento bacteriano en hongos pertenecientes al género *Penicillium*, fue ya descrita por científicos como Tyndall, Lister, Huxley y Duchesne durante la segunda mitad del siglo XIX. La importancia del descubrimiento de Alexander Fleming en 1928 del primer antibiótico de éxito terapéutico, producido por el hongo *Penicillium notatum*, significó el inicio de la edad de oro de los antimicrobianos. La producción de penicilinas no está restringida a *P. notatum* y

*Penicillium chrysogenum*, sino que varias especies de *Aspergillus* y ciertos miembros de los géneros *Trichophyton* y *Epidermophyton* son también productores. La **Penicilina G** (bencilpenicilina) comenzó a utilizarse en clínica en 1942, revolucionando el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la primera mitad del siglo XX, como la fiebre escarlata, la neumonía, la gonorrea y las infecciones por estafilococos.

Desde el descubrimiento de las penicilinas hasta la actualidad, se han empleado una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos naturales y derivados semisintéticos para el control de enfermedades infecciosas. Estas moléculas representan más de la mitad del consumo total de los antibióticos, principalmente por su alta efectividad y baja toxicidad para los humanos y los animales. Los principales grupos se resumen a continuación.

i. El núcleo de las **penicilinas**, conocido como *penam* es el ácido aminopenicilánico (6-APA), compuesto por un anillo  $\beta$ -lactámico característico y un segundo anillo tiazolidina de 5 carbonos (Figura 1.3). Se acompaña de una cadena lateral acil (R-CO-) en el grupo amino del C6 del núcleo. La cadena lateral es el principal factor de variabilidad dentro de las penicilinas y su composición depende, en última instancia, de los precursores disponibles en el medio. La identificación de la estructura química de las penicilinas (Batchelor *et al.*, 1959) permitió una serie de modificaciones a partir de acilaciones químicas de las cadenas laterales, dando lugar a un número cada vez mayor de penicilinas semisintéticas con un espectro de acción superior como: a) **penicilinas resistentes a penicilinasas estafilococales**, moléculas tremendamente útiles hasta la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina; b) **penicilinas con alta capacidad de penetración** a través de la membrana externa de gramnegativos, funcionales sobre todo frente a *E. coli* y con mayor capacidad de penetración por ser más hidrofílicas que la penicilina G; c) **penicilinas con sustituyentes laterales cargados negativamente**, desarrolladas para combatir las infecciones nosocomiales cada vez más comunes y especialmente activas frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* y d) **acilampicilinas**, moléculas con sustituyentes carboxilo, farmacocinéticamente más estables y resistentes a la degradación por enzimas bacterianas.

ii. En 1955, y a partir de experimentos de purificación de la penicilina N producida por el hongo *Cephalosporium acremonium* (= *Acremonium chrysogenum*), se descubrió la **cefalosporina C**, capaz de absorber fuertemente la luz ultravioleta, estable en medio ácido,

resistente a las enzimas degradadoras de las penicilinas y de baja toxicidad. La principal desventaja fue su baja potencia de acción. La elucidación de la estructura de la Cefalosporina C (Newton y Abraham, 1955) mostró que su núcleo, denominado *cefem* (7-ACA), consta de un anillo  $\beta$ -lactámico típico, fusionado con un anillo dihidrotiazínico diferente al de las penicilinas. Son comunes la presencia de un grupo carboxilo en el C4 y una cadena lateral  $\beta$ -acilamínica en el C7 (-R1). Sin embargo, este núcleo también permite la adición de distintos sustituyentes en el C3 (-R2) (Figura 1.3).

A partir de la década de los 60 y con el conocimiento de la ruta de biosíntesis de la cefalosporina C, han ido obteniéndose diversos grupos de cefalosporinas semisintéticas, lo cual ha llevado a ampliar su espectro antibacteriano (*Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., etc.), su estabilidad frente a la hidrólisis por enzimas bacterianas y sus propiedades farmacocinéticas. Clínicamente se han dividido en compuestos de primera, segunda, tercera y cuarta generación, de acuerdo al desarrollo histórico y a sus características estructurales y antibacterianas. **Las cefalosporinas de primera generación** presentan una mayor actividad frente a cocos grampositivos como *S. aureus* sensible a meticilina, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, carecen de actividad sobre *Enterococcus* spp. Su acción frente a los bacilos gramnegativos está limitada a cepas de *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis* no productoras de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas y/o plasmídicas (Marshall y Blair, 1999).

**Las cefalosporinas de segunda generación** ejercen su actividad sobre *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*. En el momento de su aplicación representaron el principal mecanismo de acción frente a las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM (véase apartado 1.4.3), codificadas en plásmidos R y resistentes a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación. En esta generación se incluye a las **cefamicinas**, producidas por varias especies de *Streptomyces* y *Nocardia*, que químicamente son 7-alfa metoxi-cefalosporinas (Fried y Hinthorn, 1985) y a las **carbacefemas** que se caracterizan por tener sustituido el azufre del anillo dihidrotiazínico del grupo cefem por un carbono (carba) de un grupo metileno (CH<sub>2</sub>).

Las **cefalosporinas de tercera generación** son compuestos semisintéticos que se caracterizan por la presencia de un anillo 2-aminotiazolil en el C7 como cadena lateral y

por una elevada actividad sobre las enterobacterias, excepto sobre cepas hiperproductoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *H. influenzae*, *Neisseria* spp., *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Klein y Cunha, 1995).

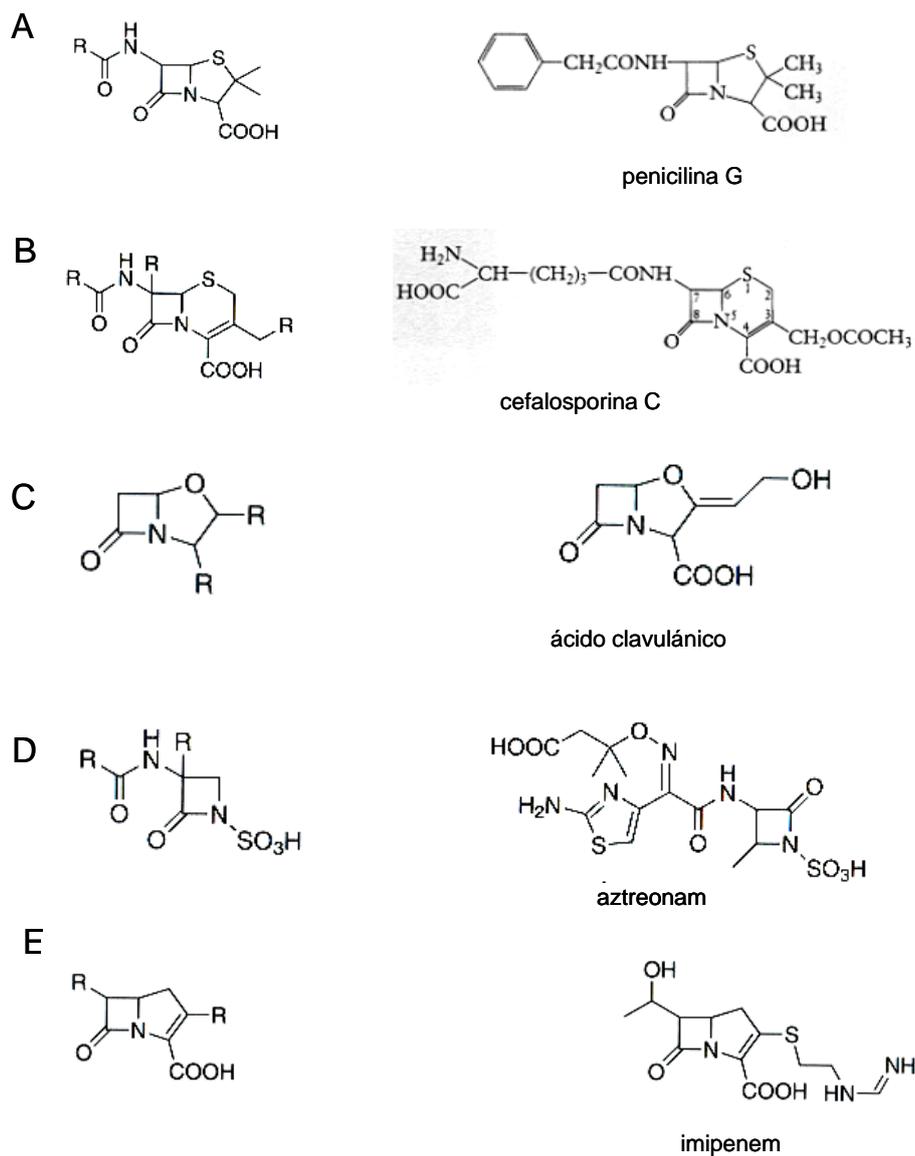
**Las cefalosporinas de cuarta generación** se caracterizan químicamente por la presencia de un grupo metoxi-imino aminotiazolil en la posición R1 del núcleo *cefem* y por la presencia de un nitrógeno cuaternario en R2. Este grupo se mantiene cargado positivamente tanto en condiciones de pH ácido como básico. La asociación de esta carga neta positiva con una carga negativa en el C4 del núcleo *cefem* hace de estos antibacterianos moléculas zwitteriónicas, es decir, moléculas con un balance entre sus cargas positivas y negativas en los rangos de pH encontrados *in vivo* (Mella *et al.*, 2001). Esta característica químico-estructural explica porqué estas cefalosporinas penetran mucho más a través de las porinas al espacio periplasmático de las bacterias gramnegativas. Estos compuestos tienen una actividad superior sobre bacilos multirresistentes (*Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia*, algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* y *E. coli* hiperproductores de BLEE). En cambio, sobre *P. aeruginosa*, las moléculas de esta generación tienen una actividad similar a la de las de tercera generación.

iii. En 1976, Brown y colaboradores descubrieron las **clavamas** al hallar un compuesto con capacidad inhibitoria de las  $\beta$ -lactamasas, el ácido clavulánico (Brown *et al.*, 1976). Esta molécula, descubierta en un cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, es producida también por otras especies de *Streptomyces*. Su núcleo consta de un anillo de oxazolidina, análogo al de las penicilinas, pero en el que el azufre está sustituido por un átomo de oxígeno y carece de la cadena lateral en el C6 (Figura 1.3). Posee una baja actividad antibiótica, aunque es un excelente inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas de clase A y D, siendo menos activo contra las de clase C, e inactivo contra las metaloenzimas de la clase B y las penicilinasas cromosómicas del grupo 4 (véase apartado 1.4.1). Su mecanismo de acción radica en que es capaz de unirse irreversiblemente al grupo hidroxilo de la serina del sitio activo de la enzima, produciendo un acilado intermedio muy estable, inhibiendo así su actividad. Esta característica hace que sea uno de los antibióticos combinados más importantes en clínica, administrándose junto con penicilinas de amplio espectro. Otras moléculas, pertenecientes a esta familia y descubiertas con posterioridad al ácido

clavulánico, son el sulbactam, con capacidad inhibitoria inferior y el tazobactam, con una actividad similar a la del ácido clavulánico (Payne *et al.*, 1994).

iv. En 1976 se descubrieron un conjunto de moléculas antibióticas, que no presentaban el anillo  $\beta$ -lactámico fusionado, a las que se les denominó **Nocardicinas** y que nunca fueron comercializadas. Varios años después, se observó que varios  $\beta$ -lactámicos monocíclicos eran producidos por un gran número de bacterias como *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Gluconobacter*, *Acetobacter* y *Flexibacter* (Sykes *et al.*, 1981). El monobactámico más simple está producido por *Chromobacterium violaceum* y contiene una cadena lateral N-acetil y un grupo metoxi en posición 3- $\alpha$  del anillo. La mayoría de monobactamas naturales tienen una actividad antibacteriana moderada. Sus derivados comerciales son el aztreonam (Figura 1.3), con una buena actividad antibacteriana frente a las bacterias patógenas gramnegativas, incluida *P. aeruginosa*, y el carumonam con las mismas propiedades pero más estable frente a ciertas  $\beta$ -lactamasas (Demain y Elander, 1999).

v. En 1979, Kahan y colaboradores descubrieron la producción de un nuevo antibiótico, denominado tienamicina, producido por *Streptomyces cattleya*, productor también de cefamicina C (Kahan *et al.*, 1979). Varias especies de *Streptomyces*, *Serratia* spp., *Erwinia carotovora* y *Photobacterium luminescens* son también productoras de moléculas de **Carbapenemas** más simples. La tienamicina es el antibacteriano natural no tóxico de más amplio espectro y más potente que se ha descrito. Sin embargo, químicamente es muy inestable. Su descubrimiento conllevó el desarrollo **de nuevos derivados semisintéticos de carbapenemas**. En la actualidad, se conocen más de 50 moléculas con diversos espectros de acción contra los patógenos grampositivos y gramnegativos más importantes. Su estructura molecular, conocida como núcleo **penem**, es similar a la de las penicilinas en tanto que presentan un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado con un anillo tiazolidínico (Figura 1.3). Sin embargo, difieren en que este último está insaturado y contiene un átomo de carbono sustituyendo al azufre. El derivado semisintético más utilizado y estable es la N-formimidoyltienamicina, conocido como imipenem. Éste se administra en clínica acompañado de la cilastatina, inhibidor de la dehidropeptidasa renal, enzima que hidroliza al imipenem. Actualmente, existen nuevas moléculas semisintéticas de aplicación clínica que amplían su espectro de acción y su vida media y otras que se encuentran en estudio.



**Figura 1.3.** Estructura molecular de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. (A) penicilinas, (B) cefalosporinas, (C) clavamas, (D) monobactamas y (E) carbapenemas. Figura adaptada de Walsh, (2003a).

En la Tabla 1.2 se muestran los principales antibióticos  $\beta$ -lactámicos de cada uno de los grupos anteriormente comentados.

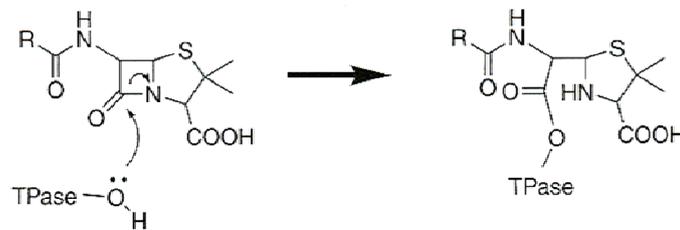
**Tabla 1.2.** Antibióticos β-lactámicos más importantes.

<b>Grupo</b>		<b>Antibiótico</b>
<b>Penámicos</b>	Penicilinas	penicilina G, penicilina V.
	Aminopenicilinas	ampicilina, amoxicilina.
	Carboxipenicilinas	carbenicilina, ticarcilina, caxfecilina, carindacilina, sulbenicilina.
	Acilampicilinas	apalcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina.
	Oxazolilpenicilinas	meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, nafcilina.
	Antipseudomonales	ticarcilina, carbenicilina, sulbenicilina.
	Farmacocinéticamente mejorados	pivampicilinas, bacampicilinas.
	Otros	epicilina, ciclacilina.
<b>Cefalosporinas</b>	1ª generación	cefalotina, cefapirina, cefradina, cefazolina, cefalexina, cefaloridina, cefazafur, ceforadina, ceftezole, cefasetrile, cefaprin, cefaloglicina, cefaridina.
	2ª generación	cefáclor, cefuroxima, cefamandole nafato, ceforanida, cefotiam, cefadroxil cefbuperazone, cefodizima, cefonicid.
	3ª generación	cefotaxima, ceftriaxona, cefpodoxima, cefizoxima, cefoperazona, ceftiazidima, moxalactam, cefmenoxima, cefsulodina, cefodizima, cefixima, ceftibuten.
	4ª generación	cefepime, ceftiroma, cefoselisa, cefclidina, ceftazopram, ceftuprenam.
	Cefamicinas <sup>a</sup>	cefoxitina, cefotetan, cefmetazole.
	Carbacefemas <sup>a</sup>	loracarbef.
<b>Clavamas</b>		ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam.
<b>Carbapenemas</b>		tienamicina, ácido olivánico, carpetimicina, imipenem, meropenem, panipenem, ertapenem.
<b>Monobactamas</b>		aztreonam, carumonam.

<sup>a</sup> Se corresponden con la 2ª generación de cefalosporinas.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son agentes bacteriolíticos ya que provocan la lisis celular. Ejercen su acción a nivel de la pared celular en crecimiento, inhibiendo la última etapa de biosíntesis del péptidoglicano, la formación de las uniones cruzadas, conocida como transpeptidación. Las enzimas transpeptidasas y carboxipeptidasas que participan en esta etapa son también capaces de unirse covalentemente a las penicilinas y a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. De ahí que se denominen proteínas de unión a la penicilina (PBP) (Tomasz, 1979).

La serina del sitio activo de las PBP ataca al carbonil del anillo  $\beta$ -lactámico generando un intermediario enzimático acilado con el anillo  $\beta$ -lactámico abierto. Este compuesto inactivo se va acumulando en la bacteria ya que es de degradación lenta (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Ataque suicida de las transpeptidasas (TPase) a la penicilina. Figura adaptada de Walsh (2003a).

La inactivación de las PBP impide la formación de uniones cruzadas entre las cadenas de peptidoglicano de la pared celular en crecimiento. Esto se traduce en una mayor laxitud de esta envuelta. Además, este efecto se incrementa también gracias a la acción de las autolisinas que degradan determinadas zonas del péptidoglicano para permitir el crecimiento celular. El resultado de todo ello es la lisis celular fruto de las fuerzas osmóticas y mecánicas que actúan sobre la pared celular.

### 1.3.1 Mecanismos de resistencia a los $\beta$ -lactámicos

La resistencia puede ser cuantificada en condiciones de laboratorio determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antibiótico concreto, concentración

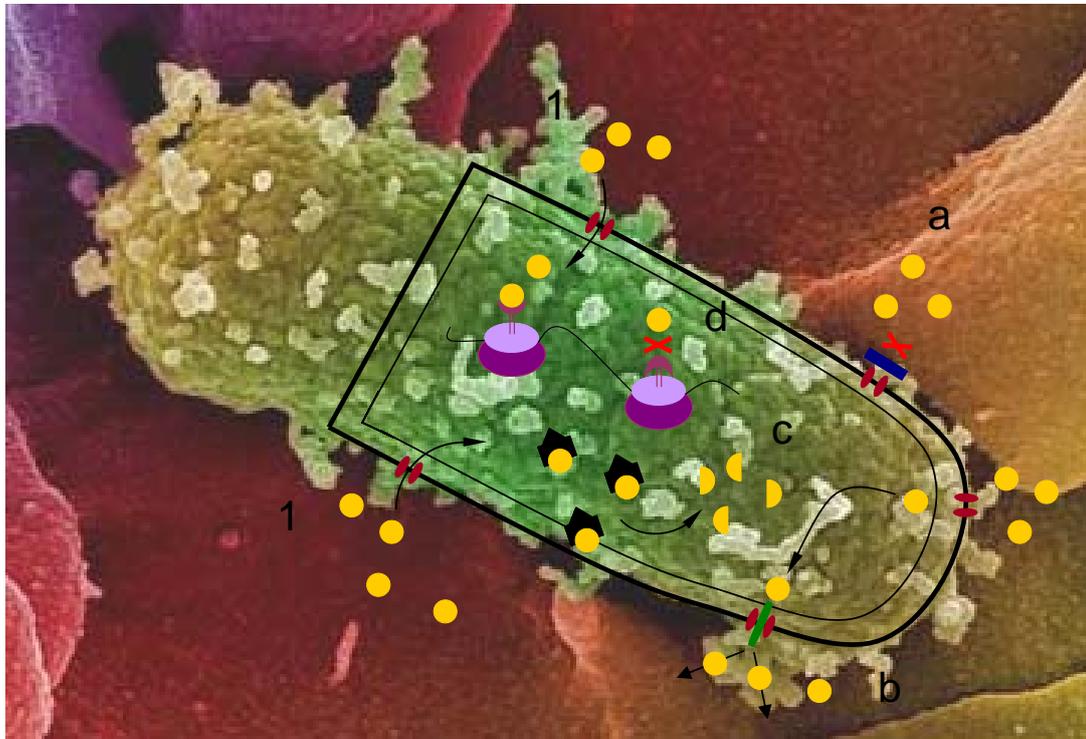
antimicrobiana por la cual se inhibe totalmente el crecimiento de un microorganismo. Desde un punto de vista clínico, una cepa es resistente si sobrevive a una terapia antimicrobiana concreta. Esto dependerá de la distribución bacteriana en el hospedador y de la farmacocinética y farmacodinámica del antibiótico (Guardabassi y Courvalin, 2006).

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos (Figura 1.5). La base genética de estos mecanismos puede ser cromosómica, conocida como **resistencia natural** o **intrínseca**, la cual es una característica estructural o funcional presentada por algunas cepas bacterianas. Sin embargo, la aparición de mutaciones en el cromosoma o la adquisición de información genética, contenida en plásmidos, transposones o integrones pueden hacer que las bacterias presenten nuevas resistencias a antimicrobianos. Este tipo de resistencias se conoce como **resistencia adquirida**. La adquisición de DNA exógeno puede realizarse mediante transformación, transducción y transferencia célula a célula por conjugación (Snyder y Champness, 1997), siendo este último mecanismo uno de los más importantes, ya que genes de resistencia a los antimicrobianos suelen localizarse en plásmidos o transposones conjugativos.

En general, en las bacterias gramnegativas causantes de infecciones, el mecanismo de resistencia mayoritario frente a los  $\beta$ -lactámicos es la hidrólisis enzimática, causada por la presencia de  $\beta$ -lactamasas en el espacio periplasmático. El grado de resistencia que generan estas enzimas se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes  $\beta$ -lactámicos y propiedades hidrolíticas. La síntesis de las  $\beta$ -lactamasas puede ser constitutiva, como ocurre en el caso de algunas de ellas codificadas en el cromosoma o en plásmidos. En este último caso, la concentración de la enzima está en relación al número de copias del plásmido. No obstante, también se conocen  $\beta$ -lactamasas cuya síntesis es inducible, las cuales están típicamente codificadas en el cromosoma. Una característica a resaltar es que los propios antibióticos  $\beta$ -lactámicos pueden ser agentes inductores de la síntesis de  $\beta$ -lactamasas, si bien no todos ellos tienen la misma potencia inductora (Marín y Gudiol, 2002).

Otros mecanismos implicados en la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos son: i) alteración de la permeabilidad de la membrana externa, debida generalmente a mutaciones en las proteínas formadoras de los canales de membrana; ii) alteraciones de las bombas de eflujo,

como consecuencia de mutaciones en las proteínas transmembrana, las cuales amplían su sustrato y bombean al exterior el antimicrobiano y iii) alteración de la diana del antibiótico, por mutaciones en las PBP que comportan una pérdida de la afinidad de los  $\beta$ -lactámicos por las mismas, disminuyendo así su actividad (Guardabassi y Courvalin, 2006).



**Figura 1.5.** Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gramnegativas. 1: entrada del antibiótico al espacio periplásmico o al citoplasma celular; a) disminución de la permeabilidad; b) bombas de eflujo; c) hidrólisis enzimática: inactivación o degradación del antimicrobiano y d) modificación de la diana de la enzima.

## 1.4 $\beta$ -lactamasas

La detección de bacterias resistentes al primer antibiótico  $\beta$ -lactámico conocido se describió incluso antes del uso en clínica de la penicilina (Abraham y Chain, 1940) y ha ido en aumento a raíz de la utilización masiva de estos antibacterianos en el tratamiento de infecciones.

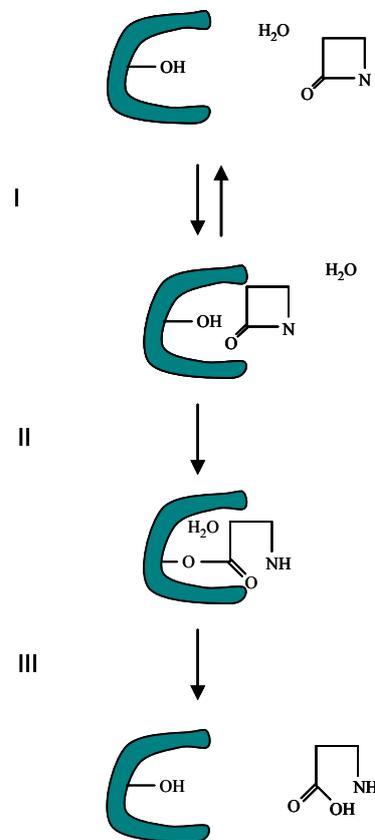
Se cree que las  $\beta$ -lactamasas son fruto de una evolución de las PBP, ya que comparten un alto grado de homología con ellas (Walsh, 2003b). De hecho, se ha sugerido que la excreción de las proteínas PBP funcionó como un mecanismo de defensa ante la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos en el medio. La mejora de este mecanismo de detoxificación habría dado lugar a enzimas específicos sin actividad transpeptidasa, pero capaces de hidrolizar a los  $\beta$ -lactámicos. De esta forma, parece que las proteínas ancestrales de las  $\beta$ -lactamasas estarían involucradas en el metabolismo de la pared celular y en la protección frente a antibióticos segregados por hongos (Livermore, 1998) y por ciertos tipos de bacterias. En la actualidad, las  $\beta$ -lactamasas han ampliado enormemente su espectro de acción, a la vez que los genes que las codifican se han movilizadado desde el cromosoma a plásmidos e integrones.

### **1.4.1 Clasificación**

Se sabe que el mecanismo de acción de determinadas  $\beta$ -lactamasas pasa por la actuación de la serina de su sitio activo, mientras que otras requieren un ión zinc en su sitio activo para atacar al anillo  $\beta$ -lactámico. El resultado es la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico, generando un antibiótico inactivo y una enzima activa de nuevo. En la Figura 1.6 se esquematiza dicho mecanismo de acción.

La necesidad de clasificar a estas enzimas surgió cuando se descubrió que determinadas  $\beta$ -lactamasas eran capaces de degradar a las cefalosporinas, lo cual las diferenciaba del resto de las enzimas conocidas hasta el momento, activas solamente frente a penicilinas. La primera clasificación, realizada por Sawai y colaboradores en 1968, ordena a las cefalosporinasas y penicilinasas en función de su respuesta al antisuero. El esquema propuesto por Richmond y Sykes en 1973, incluye a todas las  $\beta$ -lactamasas de gramnegativos descritas hasta el momento y se basa en sus perfiles de sustrato. Posteriormente, se actualizó en 1976 con la inclusión de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas. En 1980, Ambler dividió a estas enzimas en cuatro clases en función de su estructura molecular (clases A, B, C y D), incluyendo en la clase B a todas aquellas  $\beta$ -lactamasas que contenían zinc en su sitio activo. Más tarde, el esquema propuesto por Bush en 1989 y revisado en 1995 por Bush y colaboradores, correlaciona por primera vez el tipo de

sustrato, la capacidad inhibitoria y la estructura molecular de las enzimas y engloba a las enzimas en cuatro grupos (Bush, 1989 a,b; Bush *et al.*, 1995) (Tabla 1.3).



**Figura 1.6.** Mecanismo de acción de las β-lactamasas. Las fases de la reacción son: (I) Se produce una unión reversible y no covalente entre la enzima y el anillo β-lactámico. (II) El grupo hidroxilo libre del residuo de serina del sitio activo rompe el anillo β-lactámico, formándose un enlace acil covalente. (III) Hidrólisis del enlace acil mediante la intervención de una molécula de agua, liberándose el antibiótico inactivo y la β-lactamasa activa. Adaptación de D. M. Livermore (1998).

El **grupo 1** se corresponde con la clase molecular C de Ambler, e incluye cefalosporinas poco sensibles al ácido clavulánico. Muchas de ellas son cromosómicas y se encuentran en *P. aeruginosa* y en algunas especies de enterobacterias. No obstante, cabe destacar que cada vez se están identificando un mayor número de enzimas codificadas en plásmidos, como es el caso de la gran mayoría de los alelos CMY y LAT, los cuales

proceden del alelo cromosómico de *Citrobacter freundii* (Hall y Barlow, 2004), y de las nuevas cefalosporinas plasmídicas de aislados clínicos de *K. pneumoniae*, las cuales estructuralmente son similares a las  $\beta$ -lactamasas de *E. cloacae*, *C. freundii* y *P. aeruginosa* (Papanicolaou *et al.*, 1990; Horii *et al.*, 1994).

En el **grupo 2** se incluye un gran número de enzimas que generalmente están inhibidas por el ácido clavulánico y son en su mayoría plasmídicas. En este grupo se localizan todas la  $\beta$ -lactamasas derivadas probablemente de bacterias del suelo (*Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Bacillus*, *Lysobacter* y *Mycobacterium*) y de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de amplio espectro de sustrato de *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* y *Yersinia enterocolítica* (Medeiros, 1997). Pertenecen a la clase A y, en menor número, a la D de Ambler. Este grupo 2 se ha dividido en ocho subgrupos en función de los sustratos que hidrolizan (penicilinas, cefalosporinas, oxiiimino- $\beta$ -lactamas, cloxacilinas, carbenicilinas o carbapenemas). Así, el subgrupo 2a incluye a las penicilinasas, el grupo 2b a aquellas enzimas capaces de inactivar penicilinas y cefalosporinas y se las conoce como enzimas de amplio espectro de sustrato. A su vez, en este subgrupo se diferencian las que presentan un espectro extendido de sustrato (BLEE), por lo que son capaces de inactivar a la tercera generación de cefalosporinas y monobactamas (subgrupo 2be), y aquellas que son enzimas resistentes a los inhibidores, que derivan por mutaciones puntuales de las  $\beta$ -lactamasas TEM-1 y TEM-2 y más raramente de SHV-5 (subgrupo 2br). En el grupo 2 también se distingue entre las enzimas más eficientes en la hidrólisis de las carbenicilinas que de las benzilpenicilinas (subgrupo 2c), las que inactivan a las cloxacilinas más eficientemente que a las benzilpenicilinas (subgrupo 2b), las cefalosporinasas que también hidrolizan a los antibióticos monobactámicos (subgrupo 2e) y las carbapenemasas con serina en su centro activo (subgrupo 2f).

El **grupo 3** engloba un conjunto minoritario de enzimas portadoras de un ión zinc en su sitio activo. Se las conoce como metalo- $\beta$ -lactamasas, pertenecen a la clase molecular B de Ambler y son capaces de hidrolizar diferentes tipos de sustrato, incluyendo, a las carbapenemas. A pesar de que en su gran mayoría son cromosómicas, el número de enzimas de este grupo codificadas en plásmidos ha aumentado al descubrirse las enzimas

extracromosómicas en cepas de *Bacteroides fragilis*, *Serratia marcescens* o *P. aeruginosa* (Watanabe *et al.*, 1991; Bando *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1995).

Finalmente, el **grupo 4** engloba las penicilinasas que no se inhiben por el ácido clavulánico. Todas ellas están codificadas en el cromosoma y sin clasificación, según los criterios de Ambler.

### 1.4.2 Distribución

Se cree que la adquisición, por parte de elementos móviles como los plásmidos, de genes cromosómicos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (*bla*), comenzó durante los primeros estadios del uso terapéutico de estos antibióticos. De hecho, pocos años después de la introducción de la penicilina para su uso en clínica, se detectaron cepas de *S. aureus* resistentes a dicho antibiótico, que portaban penicilinasas codificadas en plásmidos (Bradford, 2001). En 1965, se descubrió el primer plásmido portador de una  $\beta$ -lactamasa TEM-1 en una cepa de *E. coli* de un cultivo de sangre de un paciente griego llamado Temoneira (Datta y Kontomichalou, 1965). En la actualidad, la expansión de dicha  $\beta$ -lactamasa y de sus derivados ha sido tal, que pueden localizarse en diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*. Otra  $\beta$ -lactamasa originaria del cromosoma de *K. pneumoniae*, que ha sido frecuentemente localizada en plásmidos de *E. coli* y *K. pneumoniae* es la SHV-1 (Sulfhydryl reagent variable). Sin embargo, las enzimas con mayor incidencia clínica y de creciente dispersión geográfica, en particular, en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, son las BLEE (Bradford, 2001). Cabe destacar el hecho de que existe un creciente número de publicaciones en donde se describe una alta incidencia de BLEE en cepas de origen animal (Carattoli *et al.*, 2005a; Hopkins *et al.*, 2006; Liebana *et al.*, 2006).

**Tabla 1.3.** Clasificación de las β-lactamasas.

Grupo funcional <sup>a</sup>	Subgrupos principales	Clase molecular <sup>b</sup>	Centro activo	Inhibición		Atributos del grupo funcional y enzimas distintivas
				Ácido clavulánico	EDTA	
1		C	serina	-	-	Confieren resistencia a los β-lactámicos excepto a las carbapenemas. <b>Cromosómicas y plasmídicas:</b> ABA-1, ACT-1 ACC-1/2, BIL-1, BUT-1, CEP-1, CMY-1 a CMY-23, DHA-1 a DHA-3, FOX-1 a FOX-6, LAT-1 a 4, MIR-1 a MIR-3, MOX-1/2.
2	2a	A	serina	+	-	Penicilinasas <b>cromosómicas y plasmídicas</b> de grampositivos.
	2b	A	serina	+	-	Penicilinasas y cefalosporinasas de amplio espectro de sustrato. <b>Cromosómica:</b> de <i>K. pneumoniae</i> . <b>Plasmídicas:</b> SHV-1, OHIO-1, TLE-1/2, ROB-1, LXA-1, HMS-1, TEM-1/2.
	2be	A	serina	+	-	Enzimas de espectro extendido, resistencia a penicilinas, oximinocefalosporinas (1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> y 3 <sup>a</sup> generación) y monobactamos. <b>Cromosómicas:</b> OXY de <i>K. oxytoca</i> , KLUA-1 a KLUA-12 de <i>Kluyvera ascorbata</i> , KLUC-1 de <i>Kluyvera cryocrescens</i> y KLUG-1 de <i>Kluyvera georgiana</i> . <b>Plasmídicas:</b> TEM-3 a TEM-29, TEM-42, TEM-43, TEM-46 a TEM-50, TEM-52 a TEM-58, TEM-60 a TEM-64, TEM-66 a TEM-72, TEM-75, TEM-79 a TEM-102, TEM-104 a TEM-155; SHV-2 a SHV-92 (excepto SHV-10); CTX-M-1 a CTX-M-43, CTX-M-46 a CTX-M-58; Toho-1/2; OXA-2, OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32 OXA-35, UOE-1/2, GES-1 a GES-9; PER-1 a PER-3; VEP-1 a VEP-3, SFO-1, FEC-1, CME-1, SFO-1 y TLA-1.
	2br	A	serina	-	-	Penicilinasas derivadas de TEM resistentes a inhibidores denominadas IRT (Inhibitor Resistant TEM) <b>Plasmídicas:</b> TEM-30 a TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76 a TEM-78, TEM-80, TEM-103, SHV-10 e IRKO-1.
	2c	A	serina	+	-	Penicilinasas y carbenicilinasas <b>plasmídicas:</b> PSE-1 (CARB-2), PSE-3, PSE-4 (CARB-1), PSE-5 (CARB-7), CARB-3 a CARB-9.
	2d	D	serina	+/-	-	Penicilinasas y oxacilinasas <b>plasmídicas:</b> OXA-1 a OXA-98.
2e	A	serina	+	-	Penicilinasas y cefalosporinasas <b>cromosómicas:</b> CepA de <i>B. fragilis</i> , CblA de <i>Bacteroides uniformis</i> , CfxA de <i>Bacteroides vulgatus</i> , Form II de <i>C. diversus</i> , FPM-1 de <i>P. mirabilis</i> , Blal de <i>Y. enterocolitica</i> . Sed-1 de <i>Citrobacter koseri</i> y <i>Citrobacter sedlakii</i> , L-2 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . <b>Plasmídicas:</b> CepA, FEC-1, FUR, FPM-1.	
2f	A	serina	+	-	Penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas <b>cromosómicas:</b> NMC-A e IMI-1 de <i>E. cloacae</i> , SME-1 a SME-3 de <i>S. marcescens</i> . <b>Plasmídicas:</b> KPC-1 a 4, GES-2 a 4 de <i>Bacillus cereus</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>K. pneumoniae</i> .	
3	3a	B	zinc	-	+	Metaloenzimas: penicilinasas, cefalosporinasas y carbapenemasas <b>cromosómicas:</b> CcrA de <i>B. fragilis</i> , CphA y Sfh-1 de <i>Aeromonas hydrophila</i> . BCII de <i>B. cereus</i> . <b>Inducibles:</b> L1 y THIN-B de <i>S. maltophilia</i> y <i>Janthinobacterium livicum</i> . <b>Plasmídicas:</b> IMP-1 a 23, VIM a 13, SPM-1 y GIM-1.
	3b	B	zinc	-	+	<b>Cromosómicas:</b> CphA y Sfh-1 de <i>A. hydrophila</i> .
	3c	B	zinc	-	+	<b>Carbapenemasas cromosómicas:</b> FEZ-1 de <i>Legionella gormanii</i> y GOB-1 de <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> .
4	1	ND <sup>c</sup>	serina	-	-	Penicilinasas <b>cromosómicas y plasmídicas</b> de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas paucimobilis</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> .

<sup>a</sup> Clasificación basada en características funcionales (Bush *et al.*, 1995). <sup>b</sup> Clasificación basada en características estructurales (Ambler, 1980). <sup>c</sup> no determinado.

### 1.4.3 $\beta$ -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

En los últimos 20 años, la presión ejercida por el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, tales como las oximiino-cefalosporinas, ha generado la aparición de las BLEE. Bush y colaboradores situaron a estas  $\beta$ -lactamasas en el grupo funcional 2be (Tabla 1.3). Se caracterizan por ser capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de amplio espectro y de espectro extendido, monobactamas y ser inhibidas por el ácido clavulánico. Estas características fenotípicas diferencian a las BLEE de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC, las cuales son resistentes a cefalosporinas y a inhibidores y típicamente están codificadas en el cromosoma de muchos géneros de bacterias gramnegativas, aunque también pueden localizarse en plásmidos (Philippon *et al.*, 2002).

En la actualidad, se engloban más de 200 enzimas bajo la denominación BLEE, habiéndose encontrado en diferentes especies de enterobacterias y en *P. aeruginosa*, aisladas en países de casi todo el mundo. Esta amplia distribución se ha relacionado con el hecho de que muchas de ellas deben estar codificadas en plásmidos autotransferibles. No obstante, la prevalencia de los aislados clínicos varía enormemente de un país a otro o entre hospitales de un mismo país (Bradford, 2001).

La mayoría de las BLEE que hoy conocemos derivan de las enzimas TEM-1 y SHV-1 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>). A continuación se resumen las enzimas BLEE más destacadas.

#### i. BLEE tipo TEM

TEM-1 es la  $\beta$ -lactamasa que se ha descrito con mayor frecuencia en gramnegativos. Esta enzima confiere resistencia a ampicilina, penicilina y a la primera generación de cefalosporinas, como la cefalotina (Rupp y Fey, 2003). Es la responsable de la resistencia a ampicilina en más de un 90% de las cepas de *E. coli* y de la resistencia a ampicilina y a penicilina en un número creciente de cepas de *H. influenzae* y *N. gonorrhoeae*. TEM-2 deriva de TEM-1 por una mutación puntual. La primera  $\beta$ -lactamasa cuyo patrón fenotípico fue distintivo de BLEE es la enzima TEM-3, descrita en 1989 (Sougakoff *et al.*, 1988), fruto de una mutación puntual de la enzima TEM-1. Hoy en día se sabe que las

mutaciones puntuales en el gen parental *bla*<sub>TEM-1</sub> que han dado lugar a las enzimas caracterizadas como BLEE, tienen un número limitado de posiciones. Cada una de estas enzimas presenta una especificidad de sustrato y un punto isoeléctrico concreto. Cabe destacar los cambios de aminoácidos de lisina por glutamato en las posiciones 104 y 240, serina o histidina por arginina en la posición 164 y serina por glicina en la posición 238 (Bradford, 2001). Estas enzimas se encuentran preferentemente en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* y, también, en otras especies de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *P. mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Salmonella* spp. y otros microorganismos.

## ii. BLEE tipo SHV

El gen *bla*<sub>SHV-1</sub> que codifica la enzima SHV-1, la cual confiere resistencia a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación, fue identificado por primera vez en el cromosoma de *K. pneumoniae*. Posteriormente, este gen se ha descrito en un 20% de los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina en esta especie (Tzouvelekis y Bonono, 1999). Varias mutaciones puntuales del gen *bla*<sub>SHV-1</sub> han dado lugar a las BLEE tipo SHV. La mayoría de estas variantes se caracterizan por tener una sustitución de una serina por una glicina en la posición 238. El residuo de serina en esta posición parece ser crítico para la hidrólisis de la ceftazidima y el residuo de lisina para la hidrólisis de la cefotaxima (Huletsky *et al.*, 1993). La mayoría de BLEE del tipo SHV se han encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, aunque también se han descrito en *C. diversus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Bradford, 2001).

## iii. BLEE tipo CTX-M

Este grupo de enzimas es una nueva familia de  $\beta$ -lactamasas con un espectro ampliado de sustrato que hidrolizan preferentemente a la cefotaxima. Se han descrito en varias especies de enterobacterias, destacando *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *E. coli*. En este grupo se incluye a las enzimas denominadas CTX-M (activas frente a la cefotaxima, aislada en Munich) como la CTX-M-1 (también llamada MEN-1), desde la CTX-M-2 hasta CTX-M-58 y las enzimas Toho 1 y 2. Se clasifican filogenéticamente en cinco grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25), distanciados evolutivamente unos de otros ya que no comparten más de un 94% de identidad (Bonnet,

2004). Esto lleva a pensar que la divergencia a partir de un antecesor común ocurrió en los primeros estadios.

Estas enzimas muestran tan sólo un 40% de similitud con las  $\beta$ -lactamasas tipo TEM y SHV, sin embargo, los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> poseen un alto grado de similitud con los genes cromosómicos *bla*<sub>KLUA</sub> que codifican las  $\beta$ -lactamasas del género *Kluyvera*. Las enzimas KLUA de *K. ascorbata* se incluyen en el grupo CTX-M-2, mostrando la KLUA-2 un 100% de similitud con la CTX-M-5. La KLUG-1, enzima codificada en el cromosoma de *K. georgiana*, difiere de la CTX-M-8 tan sólo en tres aminoácidos. Por todo ello, se ha propuesto que las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de los grupos CTX-M-2 y CTX-M-8 son fruto de una posible diseminación de las  $\beta$ -lactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*. Por otra parte, la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de *K. cryocrescens* (KLUC-1) comparte aproximadamente un 85% de similitud con las enzimas del grupo CTX-M-1, por lo cual se ha sugerido que la KLUC-1 podría formar un sexto grupo de CTX-M. Las enzimas cromosómicas presentan grados de similitud en sus regiones flanqueantes de entre un 83-88%, característica también descrita entre las  $\beta$ -lactamasas CTX-M plasmídicas (Poirel *et al.*, 2002; Bonnet, 2004).

Las enzimas del tipo CTX-M hidrolizan con mayor eficiencia a la cefalotina o cefaloridina que a la bencilpenicilina y, preferentemente, a la cefotaxima antes que a la ceftazidima. Todas estas enzimas presentan un residuo de serina en la posición 237, el cual juega un papel muy importante en su espectro ampliado de sustrato (Tzouveleakis *et al.*, 2000). La localización plasmídica de estas  $\beta$ -lactamasas, su fácil transferencia por conjugación y su localización entre secuencias de inserción y en integrones (Arduino *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2002a) ha facilitado su expansión y diseminación por varias zonas del mundo, estando más focalizadas en brotes e infecciones nosocomiales en el este de Europa, Sudamérica y Asia (Bonnet, 2004). Cabe destacar, sin embargo, la existencia de ciertas enzimas que se han identificado inicialmente en zonas concretas de Europa occidental como la CTX-M-9 y CTX-M-14 (Sabaté *et al.*, 2002b; García *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2007) y la CTX-M-10 (Cantón *et al.*, 2002). Actualmente, las enzimas CTX-M-14, CTX-M-3 y CTX-M-2 son las que tienen una mayor dispersión geográfica localizándose, incluso, en cepas aisladas de animales sanos, lo cual sugiere que éstos podrían comportarse como reservorio de cepas productoras de estas  $\beta$ -lactamasas (Bonnet, 2004).

#### iv. BLEE tipo OXA

Las  $\beta$ -lactamasas tipo OXA (activas contra oxacilina) forman una familia muy antigua de BLEE que se diferencian de las BLEE tipo TEM y tipo SHV en que pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Estas enzimas están codificadas tanto en cromosomas como en plásmidos y los estudios de filogenia muestran que al menos han ocurrido tres sucesos de movilización de los genes cromosómicos a plásmidos durante los últimos 500 millones de años, lo cual sugiere que la evolución de estas enzimas no ha sido causada por la presión selectiva propiciada por el uso de antibióticos en el último siglo (Barlow y Hall, 2002). La similitud entre las enzimas de este grupo no superan, en algunos casos, el 20%, por lo que su clasificación se ha realizado en función de los sustratos comunes que hidrolizan más que en atención a sus estructuras primarias (Jacoby, 2006). Todas estas enzimas confieren resistencia a la ampicilina y a la cefalotina, aunque se caracterizan por su alta actividad hidrolítica frente a la oxacilina y a la cloxacilina y por el hecho de que son poco inhibidas por el ácido clavulánico (Bush *et al.*, 1995). En general, las OXA, clasificadas como BLEE, derivan de la enzima OXA-10 (OXA-11, 14, 16, 17) por mutaciones puntuales en una o dos posiciones; una asparragina por una serina en la posición 73 y un aspartato por una glicina en la posición 157, siendo particularmente importante esta última sustitución ya que está implicada en la resistencia a la ceftazidima. La gran mayoría de estas enzimas se han identificado en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de Turquía y Francia (Bradford, 2001).

### 1.5 Los plásmidos y el control de su replicación

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico circular o lineal, presentes en los organismos procariotas y en algunos eucariotas. Su tamaño varía desde una hasta varios cientos de kilobases (Kb). Su número también puede variar, dependiendo del tipo, desde una sola copia hasta decenas por célula. Su capacidad de autorreplicación y mantenimiento dentro de la bacteria hospedadora se debe a la existencia de ciertos elementos genéticos involucrados en la replicación plasmídica, los cuales se agrupan en una unidad genética llamada **replicón**. El replicón comprende una región de entre 2 a 3 kb, que contiene los genes que codifican las proteínas de control de inicio de la replicación (*cop* e *inc*), así como las proteínas involucradas en el inicio de la replicación (*rep*) y otros elementos de

control como RNA antisentido y secuencias específicas de unión de las proteínas que colaboran en el inicio de la replicación (Couturier *et al.*, 1998). Además del replicón, los plásmidos pueden contener otros genes, como los de resistencia a los antibióticos y a los metales pesados, los de degradación de compuestos recalcitrantes o los de utilización de otras fuentes de carbono y energía. Estos genes aportan ventajas selectivas a las bacterias que los portan y les permiten colonizar nuevos nichos ecológicos (Gstalter *et al.*, 2003).

Dada la elevada diversidad de los plásmidos surgió la necesidad de ordenarlos y clasificarlos. Entre los diferentes criterios de clasificación que se han utilizado, los más empleados han sido los basados en las características de las regiones de DNA esenciales.

El fenómeno de la incompatibilidad plasmídica se define como aquel proceso por el cual un plásmido determinado inhibe el mantenimiento estable de un segundo plásmido en una célula dada. En esta situación, se considera que ambos plásmidos son incompatibles (Couturier *et al.*, 1988).

La incompatibilidad plasmídica fue descrita a comienzos de la década de los 60 del siglo pasado en el plásmido F (Maas y Maas, 1962; Scaife y Gross, 1962), al observarse que en bacterias transconjugantes, portadoras del plásmido F integrado en su cromosoma, no se replicaba otro plásmido F autónomo (Dubnau y Maas, 1968). Posteriormente, y basándose en esta característica, los plásmidos se agruparon en diferentes grupos de incompatibilidad, de forma que en cada grupo se incluyeron aquellos plásmidos que eran incompatibles. Un esquema formal basado en este criterio fue desarrollado por Datta y Hedges a principios de la década de los 70 (Datta y Hedges, 1972), existiendo en la actualidad más de 30 grupos de incompatibilidad en la familia *Enterobacteriaceae* y más de 14 en el género *Pseudomonas* (Couturier *et al.*, 1988).

En 1987, Novick estudió con detalle la incompatibilidad plasmídica, distinguiéndola entre simétrica y vectorial.

- En la **incompatibilidad simétrica** dos plásmidos que poseen el mismo replicón y que, por tanto, comparten las funciones de replicación y partición, tienen la misma capacidad para compensar las fluctuaciones que puedan generarse en el número de

copias a la hora de la replicación y de la partición. La pérdida de uno de ellos será un fenómeno al azar.

- En cambio, en la **incompatibilidad vectorial** uno de los dos plásmidos tiene más probabilidades que el otro de perderse durante la división celular. Esto ocurre con los plásmidos que contienen varios genes de control de inicio de replicación o sistemas de mantenimiento.

### **1.5.1 Funciones plasmídicas causantes de incompatibilidad y sus mecanismos**

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos que pueden constituir una sobrecarga para la bacteria. Para impedir su eliminación, los plásmidos han desarrollado un complejo sistema de control de su número de copias y mantenimiento en la bacteria. Estos sistemas son capaces de controlar y responder ante las fluctuaciones que pueden producir tanto un aumento desmesurado de su número de copias como una disminución, lo cual podría conducir a la pérdida del plásmido. Los sistemas involucrados en el control de la replicación son los responsables del fenómeno de incompatibilidad plasmídica, distinguiéndose los siguientes mecanismos:

#### **i. Control de la replicación plasmídica por RNA antisentido**

Los RNA antisentido son pequeñas moléculas de 35 a 150 nucleótidos (nt), cuya estructura forma de uno a cuatro bucles. Su actuación es tanto en *cis* como en *trans*, según sea la localización de su secuencia complementaria, denominada RNA con sentido, la cual generalmente codifica alguna de las proteínas esenciales para la replicación plasmídica. Los RNA antisentido regulan también el mantenimiento del plásmido, su conjugación, el paso crítico de lisis a lisogenia en el caso de los bacteriófagos y la regulación de las frecuencias de transposición de los elementos móviles (Wagner *et al.*, 2002).

Los RNA antisentido regulan negativamente la replicación plasmídica, se sintetizan constitutivamente y son metabólicamente inestables, de tal forma que cualquier cambio en la concentración plasmídica afecta a la concentración de estos reguladores negativos. La

variación en el número de copias del plásmido se traduce en una alteración de la frecuencia de replicación. Así, un aumento del número de copias hace que se incremente proporcionalmente la concentración de RNA antisentido con lo cual se inhibe la replicación. Por el contrario, la disminución del número de copias supone una disminución de la concentración de RNA antisentido, facilitándose así el inicio de replicación (Brantl, 2004). Cabe destacar que, en algunos casos, la regulación por el RNA antisentido va acompañada de proteínas reguladoras que funcionan como represores transcripcionales (proteínas Cop) o proteínas de unión al RNA (plásmido ColE1) (Summers, 1996).

La regulación de la replicación generada por una molécula de RNA antisentido puede realizarse a través de los siguientes mecanismos.

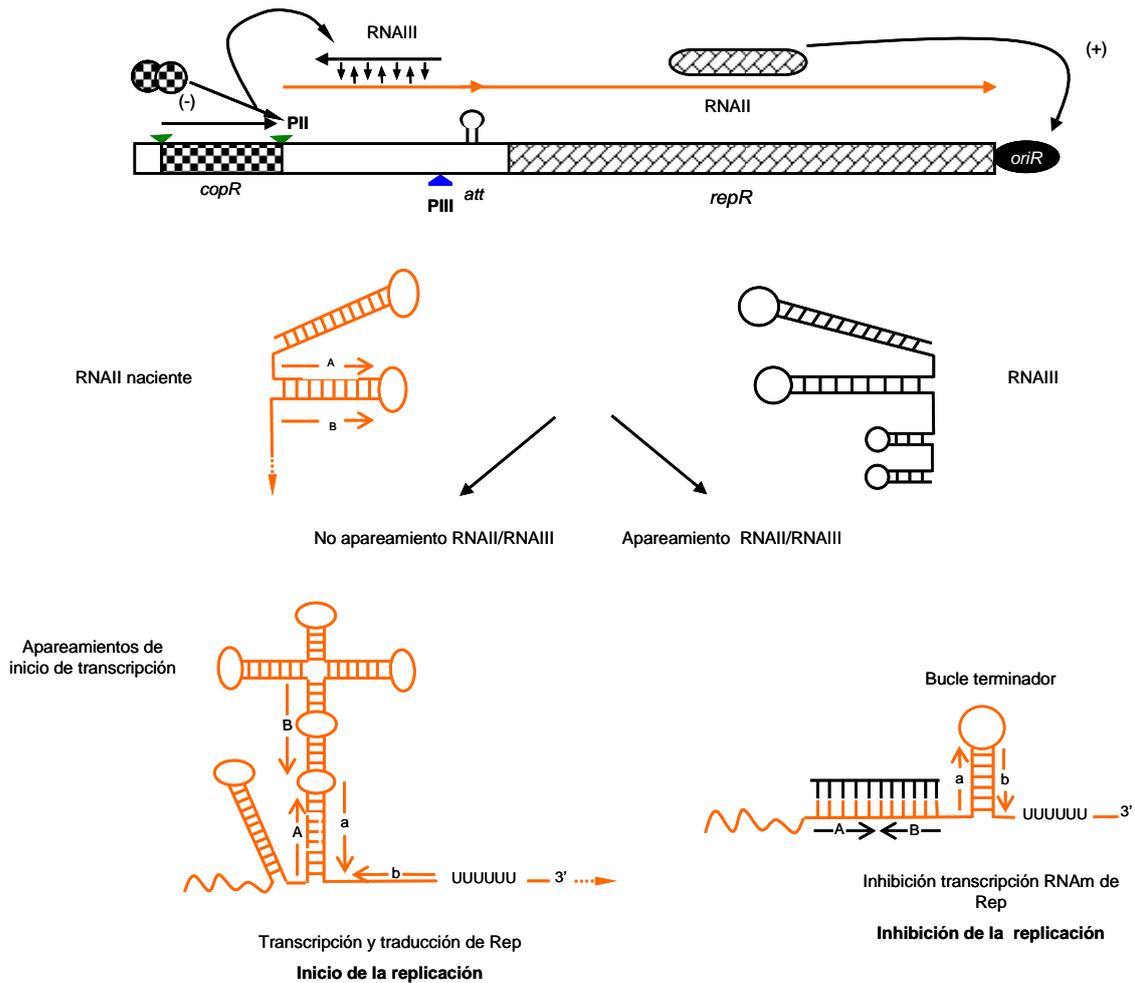
#### **a) RNA antisentido mediador de la atenuación transcripcional**

Este tipo de regulación es exclusiva de los plásmidos de las bacterias grampositivas y fue descrita por Novick y colaboradores en 1989 para el plásmido pT181 del género *Staphylococcus* (Novick *et al.*, 1989). Con posterioridad, ciertos plásmidos de amplio espectro de hospedador (*broad host range*) de *Streptococcus* mostraron este tipo de regulación. Todos ellos codifican una proteína esencial, denominada Rep, que está implicada en el inicio de la replicación y cuyo mRNA es la diana de unión del RNA antisentido. El mRNA de la proteína Rep puede adoptar dos tipos diferentes de conformación, dependiendo de la presencia o ausencia del RNA antisentido. Así, al unirse el RNA antisentido al Rep-mRNA se forma un terminador transcripcional, rho independiente, conocido como atenuador por apareamiento de las secuencias complementarias **a** y **b** aguas arriba del sitio RBS (*ribosome binding site*) de Rep, con lo cual se produce la terminación prematura de la transcripción del gen *rep* (Figura 1.7). Por el contrario, si la cadena de Rep-mRNA naciente escapa a su unión con el RNA antisentido durante su transcripción, el apareamiento tiene lugar entre las secuencias **A** y **a**, con lo cual, **a** no está disponible para aparearse con **b** y el terminador transcripcional no puede formarse. La transcripción total del gen *rep* dará lugar a un mRNA completo que podrá ser traducido a proteína, la cual será esencial para el inicio de la replicación (Brantl, 2004).

Los plásmidos, cuya regulación de la replicación tiene lugar a través de este mecanismo tienen, además, un segundo sistema de control del número de copias que depende del represor transcripcional CopR que presenta una función dual (Brantl, 1994; Brantl y Wagner, 1997). Así, la unión de CopR en forma de dímero al operador del gen *rep* provoca la disminución de la transcripción de su mRNA y, consecuentemente, la del número de copias del plásmido. La segunda función pasaría por prevenir la transcripción convergente entre los RNA con sentido y antisentido. Por otro lado, en ausencia de CopR se favorece la transcripción a partir del promotor fuerte PII, y se impide la transcripción a partir del promotor PIII, el cual daría lugar al RNA antisentido. El resultado es la síntesis del mRNA con sentido. En presencia de CopR, la represión que ésta genera sobre la transcripción del RNAII, o con sentido, permite una disminución de la transcripción convergente, favoreciéndose la transcripción a partir de PIII.

En función de lo indicado anteriormente, la regulación de la replicación por el RNA sin sentido y por CopR se llevaría a cabo de la siguiente manera (Figura 1.7):

Si el número de copias incrementa, el RNAIII antisentido de expresión constitutiva se asocia a su RNAII. La transcripción de este Rep-mRNA termina prematuramente, controlándose así el número de copias. En cambio, si el número de copias disminuye, la alta estabilidad del RNAIII hará que su concentración frente al número de copias sea muy elevada, comprometiendo el mantenimiento del plásmido en la célula. En este caso, la proteína CopR entra en juego como segundo regulador, ya que al haber un bajo número de copias, la concentración de esta proteína es baja, con lo cual se desreprime la transcripción del gen *rep*. De igual modo, la transcripción convergente desde PII a bajas concentraciones impide la transcripción del RNA antisentido desde PIII, facilitándose el inicio de la replicación y restableciéndose el número de copias. Cabe tener presente que el nuevo Rep-mRNA que se está sintetizando se apareará con el RNAIII que todavía se mantenía libre, con lo cual disminuirá su concentración. Esta regulación tan compleja impide la pérdida del plásmido cuando la bacteria está en fase de división y facilita su mantenimiento con un número de copias estable. Cabe destacar que este tipo de regulación no ha sido encontrada en plásmidos de bacterias gramnegativas.



**Figura 1.7.** Modelo de atenuación transcripcional en bacterias grampositivas. El apareamiento del RNAII con un RNAIII antisentido impide la traducción del mRNA de la proteína de inicio de la replicación. Adaptación de Brantl (2004).

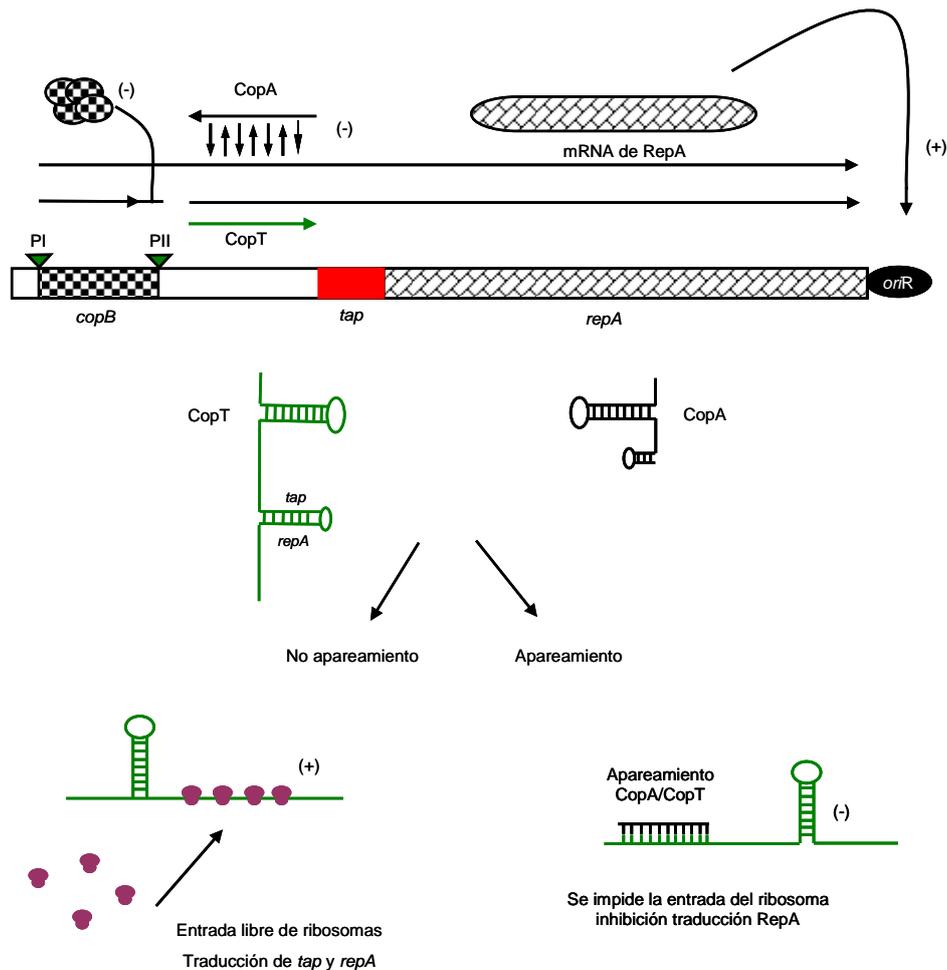
### b) Inhibición de la traducción

Este tipo de regulación ha sido bien estudiada en los plásmidos de los grupos IncFII, como el R1, IncFIC, IncFIII y otros grupos con la misma organización genética. El replicón básico de este tipo de plásmidos contiene los *orf copB*, *tap* y *repA*, un pequeño represor transcripcional, un péptido líder de 24 aminoácidos y la proteína esencial de inicio de la replicación, la cual es limitante en la replicación. El origen de la replicación se localiza aguas abajo del gen *repA*, y como mínimo consta de 188 pares de bases (pb). Además, contiene una caja DnaA (TTATCCACA), una región rica en

AT (87%), tres secuencias repetidas (TCNTTTAAA) y un posible lugar de unión de la proteína IHF (*integration host factor*). La replicación depende de la DNA girasa y de otras proteínas del huésped como DnaB, DnaC, DnaG, SSB y la DNA polimerasa III (Masai y Arai, 1988). Se sabe que aunque la proteína RepA es capaz de abrir sola la doble hélice y unir el replisoma al oriR, la caja DnaA y la proteína DnaA ayudan a optimizar la frecuencia del inicio de la replicación (Ortega-Jiménez *et al.*, 1992).

La regulación de la replicación de este tipo de plásmidos se ha estudiado sobre todo en el plásmido R1 y se ha demostrado que tiene lugar a dos niveles. Tal y como se aprecia en la Figura 1.8, por una parte interviene un RNA antisentido de 90 nt, llamado CopA, que se transcribe desde la hebra complementaria del mRNA de RepA. Esta molécula, de vida media muy corta (1-2 minutos), es capaz de formar una estructura secundaria en dos bucles, la cual se asocia a CopT que es parte de la región líder del mRNA de RepA. La unión CopA-CopT impide el acceso de los ribosomas a su lugar de unión (RBS) en el mRNA, bloqueándose así la traducción del péptido señal Tap, necesario para la traducción de RepA. Consecuentemente, CopA inhibe la traducción de RepA vía la inhibición de la traducción del péptido líder Tap. Así pues, la interacción entre un RNA antisentido y su diana, a través de contactos bucle a bucle, es un mecanismo recurrente y válido para la mayoría de casos de control de la replicación.

Además de este mecanismo de control de la replicación, el plásmido R1 dispone también de un mecanismo de control del número de copias. En este proceso interviene un represor transcripcional, llamado CopB, que se cotranscribe con Tap y RepA a partir del mismo promotor PI. En condiciones estables, CopB está asociado a un segundo promotor del gen *repA* (PII), silenciándolo, de forma que la transcripción de *repA* se realiza desde PI. CopB es un segundo dispositivo que se activa cuando el número de copias es peligrosamente bajo. En condiciones normales, la inestabilidad del mRNA de CopA es suficiente para controlar las desviaciones en el número de copias.

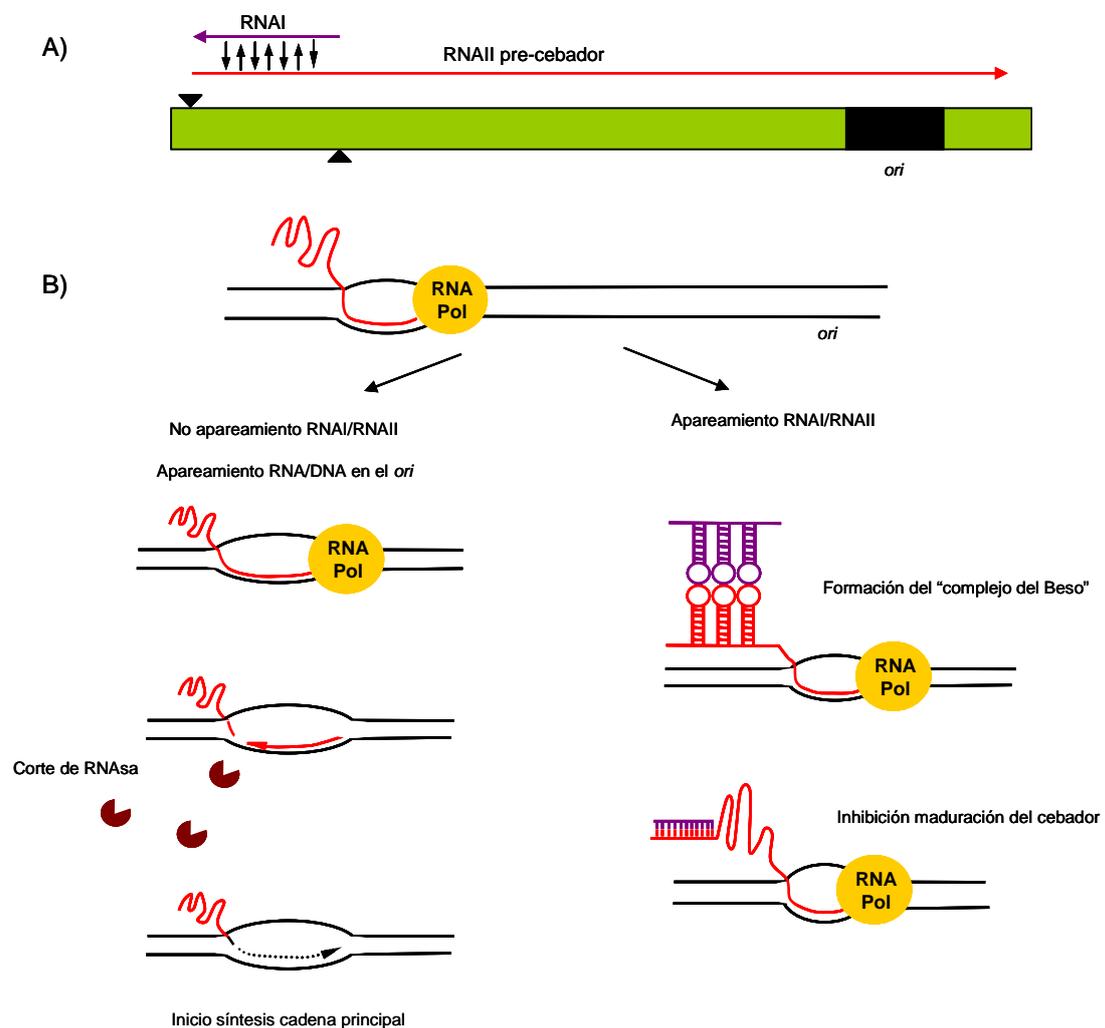


**Figura 1.8.** Modelo de inhibición de la traducción del péptido líder. La traducción del péptido líder Tap es necesaria para una correcta transcripción de *repA*. Además, la proteína CopB reprime la transcripción de *repA* pero no se autorregula. Los ribosomas se simbolizan en morado. Adaptación de Brantl (2004).

### c) Inhibición de la formación del cebador

El plásmido ColE1 es un ejemplo típico de plásmidos de alto número de copias de *E. coli* que no requieren de una proteína para el inicio de la replicación. El único componente plasmídico esencial para la replicación es un cebador de RNA, denominado RNAII, de 550 nt, el cual es la diana del control del número de copias. Este RNAII se asocia al DNA en la región del origen de replicación y se libera por la actuación de la enzima RNasa H del hospedador, dejando un cebador maduro que genera un extremo 3'OH en donde la DNA polimerasa I comienza la síntesis de la

cadena principal. El control de la replicación está mediado por un RNA antisentido, denominado RNAI, que se transcribe constitutivamente a partir de la hebra complementaria en la región del cebador RNA. Este RNAI forma una estructura secundaria de tres bucles y una cola desestructurada. La unión del RNAI con RNAII bloquea el apareamiento correcto del RNA, que funciona como cebador, con el DNA. De esta forma se impide la maduración del RNA para ser funcional como cebador (Figura 1.9).



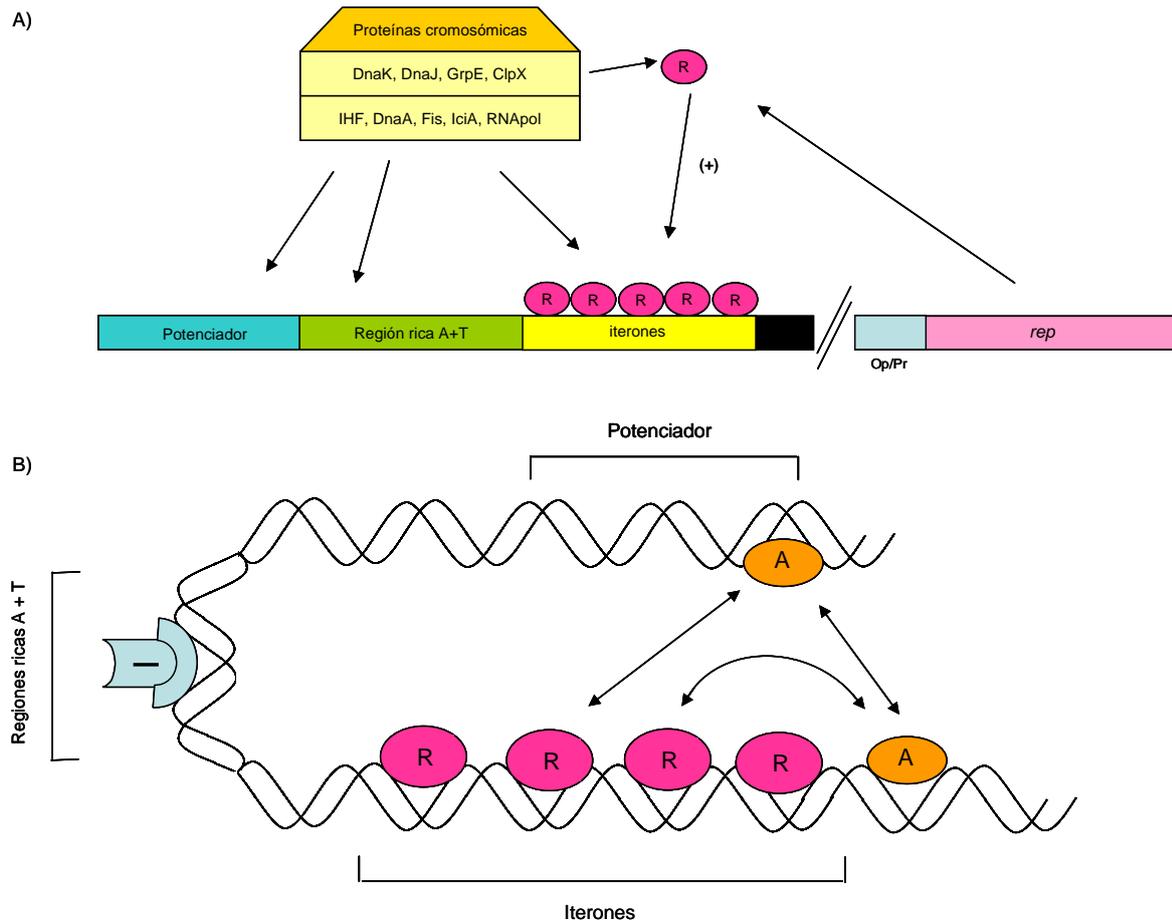
**Figura 1.9.** Inhibición de la formación del cebador (plásmido ColE1). A) Representación esquemática de la zona del replicón. B) Mecanismo de inhibición de la formación del cebador. Adaptación de Brantl (2004).

En los bucles del RNAI se han localizado mutaciones que afectan al número de copias y que dan lugar a nuevos grupos de incompatibilidad, determinando así la importancia de éstas en la especificidad y en la tasa de unión (Muesing *et al.*, 1981; Lacatena y Cesareni, 1983). Finalmente, cabe destacar el papel auxiliar que realiza una pequeña proteína denominada Rop o Rom. Rop interacciona con el RNA antisentido y con el RNA pre-cebador, incrementando la eficiencia de la unión con lo cual se produce un aumento de la inhibición de la replicación. Esta proteína no se considera como una de las determinantes de la incompatibilidad, aunque puede reforzar la incompatibilidad mediada por el RNAI (del Solar *et al.*, 1998).

## **ii. Control de la replicación plasmídica por proteínas y secuencias repetidas**

En el origen de replicación de algunos plásmidos existe un conjunto de secuencias repetidas directas o indirectas conocidas como **iterones**. El tipo de regulación plasmídica que rige en los plásmidos que contienen iterones (ICP, *iteron-containing plasmids*) se debe al reconocimiento del origen de replicación por una proteína específica, denominada Rep, la cual se une a los iterones. La importancia de éstos en el control de la replicación plasmídica se basa en diversos estudios que demostraron que la eliminación de varios iterones impedía la replicación plasmídica (Kolter y Helinski, 1982) o que mutaciones en dichas secuencias también impedían su reconocimiento por parte de RepA (McEachern *et al.*, 1985).

La presencia de iterones es típica de los plásmidos con replicación theta (Nordström, 1990) y su origen de replicación contiene, además, regiones ricas en A+T. Sin embargo, esta definición puede considerarse bastante limitada si se tiene en cuenta el alto número de interacciones cooperativas, antagonistas y neutras que pueden ocurrir en un origen de replicación. Numerosos estudios muestran que dicho origen puede contener un alto número de secuencias de unión a diversas proteínas (Rep, DnaA, IHF, Fis, IciA, RNA polimerasa y SeqA) (Figura 1.10) (Krüger *et al.*, 2004).



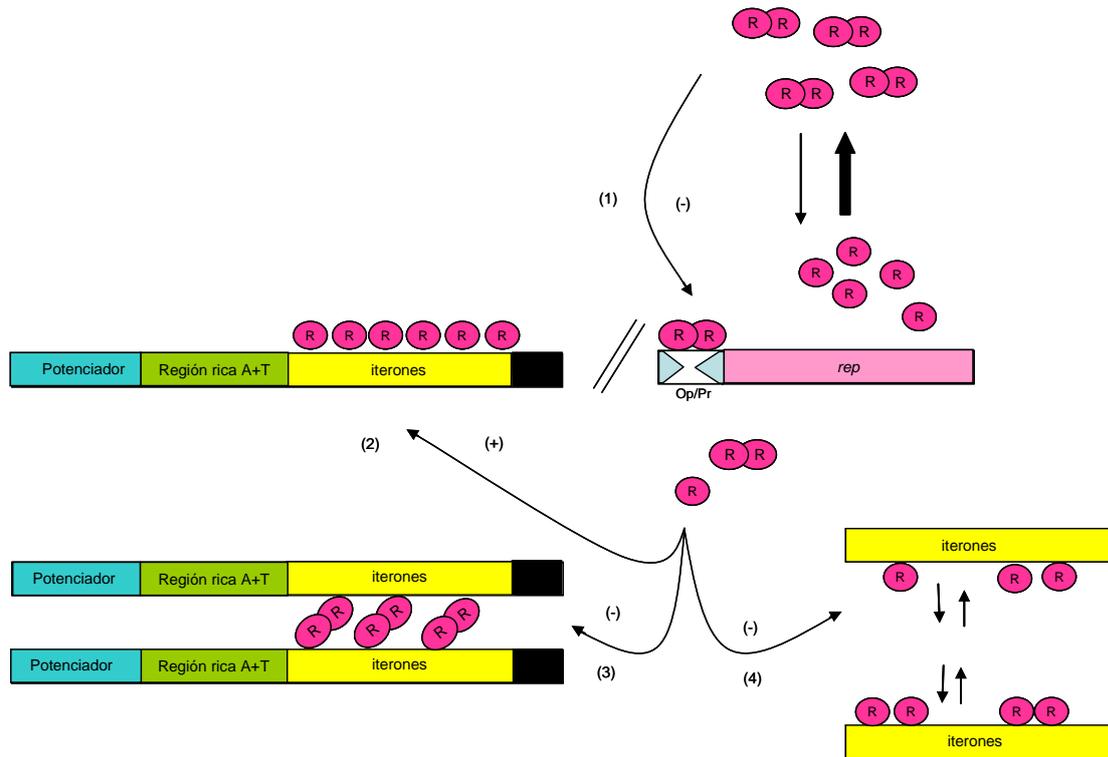
**Figura 1.10.** Representación esquemática del inicio de replicación. A) La proteína Rep (R) codificada en el gen *rep* reconoce las secuencias repetidas de los iterones del origen de replicación, estimulando la replicación del DNA plasmídico. Las proteínas cromosómicas interactúan con Rep en solución o bien cuando esta proteína está unida a los iterones. Además, dichas proteínas cromosómicas se unen también a diferentes sitios del origen de replicación del plásmido. B) Modelo de interacciones proteína-proteína. Las proteínas Rep interactúan con las proteínas cromosómicas cuyos sitios de unión pueden estar cercanos o alejados del *ori* (proteína DnaA, [A]). Las interacciones se favorecen gracias a la capacidad que tienen las proteínas de la bacteria de doblar el DNA (I). Adaptación de Krüger *et al.*, (2004).

Los estudios realizados en la gran mayoría de ICP, revelan que existe un cierto grado de homología entre las secuencias de sus iterones. Por un lado, la secuencia 5'- TGAGnG-3' parece importante para la unión *in vivo* de la proteína Rep al origen de replicación. Además, existen otras secuencias conservadas dentro de una misma familia de replicones

que contienen la información específica para ser reconocidas por la propia proteína Rep del plásmido y regiones espaciadoras altamente variables entre los replicones y los iterones de un mismo plásmido. La funcionalidad de la proteína Rep asociada a sus iterones pasaría por generar una torsión acumulativa del origen de replicación que acabaría por abrirse, facilitando así el inicio de la replicación.

El requerimiento de las proteínas Rep, en forma de monómeros, para la activación del origen de la replicación, es una función universal en este tipo de plásmidos. La variación de la concentración intracelular de Rep, además de regular la tasa de replicación, también afecta a su propia transcripción gracias a sus promotores autorregulables. El mecanismo de autorregulación del gen *rep* se basa principalmente en la unión de dímeros de Rep a su zona operadora (Figura 1.11). En la mayoría de los casos, la proteína Rep tiene una función dual, siendo capaz de activar la replicación cuando se encuentra en baja concentración y, a menudo, actuando como inhibidor de la misma cuando su concentración es elevada. Las concentraciones consideradas como normales dependen de cada sistema de replicación: 4.000 moléculas de Rep en el caso del plásmido R6K (alto número de copias) (Filutowicz *et al.*, 1986), 500 moléculas para el pSC101 (Ingmer *et al.*, 1995) y 160 moléculas para el mini-P1 (una sola copia por célula) (Swack *et al.*, 1987).

A parte de papel obvio de la proteína Rep en el inicio de la replicación plasmídica, se han descrito otros modelos de regulación en ICP. Por un lado el **modelo Esposado** que, propuesto por investigadores del sistema de replicación del plásmido R6K, se basa en la habilidad de la proteína Rep monomérica de unirse a dos orígenes de replicación, bloqueando la replicación de ambos (McEachern *et al.*, 1989). Cuando las proteínas Rep se unen a los iterones del origen de replicación y los saturan, se induce el inicio de replicación en condiciones de bajo número de copias. Al incrementar el número de copias, las proteínas Rep se unen a los nuevos iterones, interaccionando además con otros complejos Rep, de ahí que se formen las estructuras apareadas Rep-Rep, que interfieren a la hora de iniciar la replicación desde ambos orígenes de replicación (Figura 1.11). Si el volumen celular aumenta, los apareamientos se desestabilizan y puede reestablecerse la replicación (del Solar *et al.*, 1998). De acuerdo con este modelo, la concentración de iterones, más que el nivel de expresión de Rep, sería la que determinaría la tasa de replicación.



**Figura 1.11.** Modelos de regulación del inicio de la replicación de los plásmidos que contienen iterones. (1) Los dímeros de Rep se asocian a la región reguladora y operadora, inhibiendo la transcripción del gen *rep*. (2) Las proteínas Rep monoméricas se asocian a sus secuencias específicas de unión en los iterones, induciendo el inicio de la replicación. (3) Modelo Esposado. Las proteínas Rep diméricas se asocian a los iterones de dos orígenes de replicación provocando que ambos plásmidos estén en contacto, inhibiendo así la replicación de ambos. (4) Modelo *titration*. En este caso, la presencia de una serie de iterones extra pertenecientes a un segundo plásmido haría variar la concentración de proteína Rep libre en forma monomérica necesaria para el inicio de la replicación. Adaptación de Krüger *et al.*, (2004).

Un segundo modelo, denominado **modelo de cambio de concentración de Rep libre (*Titration*)**, asume que las proteínas Rep son el factor limitante para el inicio de la replicación y que los iterones modulan la concentración de Rep libre (Tsutsui *et al.*, 1983) (Figura 1.11). Sin embargo, este modelo no es capaz de explicar porqué las proteínas Rep inhiben la replicación a altas concentraciones y porqué son capaces de autorregularse,

dando a entender que no son el factor limitante. La explicación a este hecho ha venido determinada por la existencia de dímeros (inhibidores) y monómeros (iniciadores) de Rep cuya conversión ha sido demostrada *in vitro* en algunos ICP (Krüger *et al.*, 2004).

Además de los iterones y de las proteínas Rep, claves para el control de inicio de replicación, existen una gran variedad de factores cromosómicos de la bacteria que también intervienen en el inicio de la replicación, como por ejemplo la proteína DnaA, cuyo papel, en algunos casos, como en los plásmidos RK2 y RP4, es primordial (Doran *et al.*, 1999).

### **iii. Incompatibilidad mediada por los sistemas de partición**

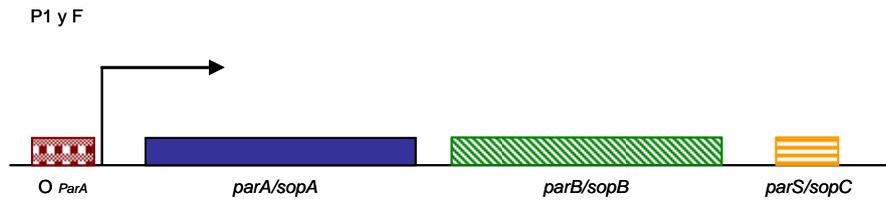
Los sistemas de partición forman parte del conjunto de estrategias de mantenimiento de los plásmidos. Éstos determinan las localizaciones específicas de los plásmidos dentro de las bacterias y coordinan su localización con el ciclo celular. Son extremadamente eficaces en plásmidos de muy bajo número de copias, aún cuando esta regulación puede ser más laxa en cepas con plásmidos de alto número de copias. El mantenimiento de un plásmido no sólo se debe a todo el conjunto de elementos reguladores, sino también a la sincronía que tenga con la bacteria. Así, la pérdida o inestabilidad de un plásmido puede ocurrir cuando esta sincronía se pierde (Novick, 1987).

Los sistemas de partición juegan también un papel importante en la incompatibilidad plasmídica, diferente a la descrita para los sistemas de replicación. De hecho, se sabe que dos plásmidos diferentes (con replicones compatibles) que son segregados a través del mismo sistema no pueden coexistir establemente en la misma bacteria. En este caso, la incompatibilidad tiene lugar como consecuencia de sistemas de partición idénticos de plásmidos diferentes. En la gran mayoría de los sistemas de partición que se han caracterizado intervienen dos proteínas plasmídicas y un sitio de unión al DNA. Este lugar se conoce con el nombre de *par*, actúa como un centrómero y se requiere para la estabilidad del plásmido. La región *par* contiene una o más secuencias repetidas invertidas como elementos de reconocimiento. La primera proteína Par de unión al DNA reconoce específicamente el centrómero, mientras que la segunda es una ATPasa que utiliza la energía del ATP para movilizar y unir los plásmidos a los lugares específicos. Ambas proteínas Par participan en la represión de sus propios genes.

Varios experimentos realizados con microscopía de fluorescencia han permitido visualizar la localización de los plásmidos y de las proteínas codificadas por éstos dentro de células individuales (Kim y Wang, 1998; Jensen y Gerdes, 1999; Pogliano *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002). Estos estudios revelan que hay una localización específica de los plásmidos dentro de la bacteria y que su orientación depende de los sistemas de partición. Además, también se determina que el número de sitios fluorescentes es más bajo que el número de copias esperado, por lo que se sugiere que los plásmidos se localizan agrupados en un número limitado de lugares de unión. Finalmente, se observa que diferentes tipos de plásmidos ocupan diferentes posiciones dentro de una bacteria, lo cual hace pensar que cada plásmido utiliza sus señales específicas de localización. Estos estudios han permitido diseñar un modelo de posicionamiento intracelular en el cual, las señales de anclaje estarían en el centro de la bacteria, mientras que la replicación y el posicionamiento previo a la división celular se situarían en las partes más distales de la célula (Funnell y Slavcev, 2004).

Dos de los sistemas de partición más estudiados son los utilizados para la segregación de los plásmidos P1 y R1.

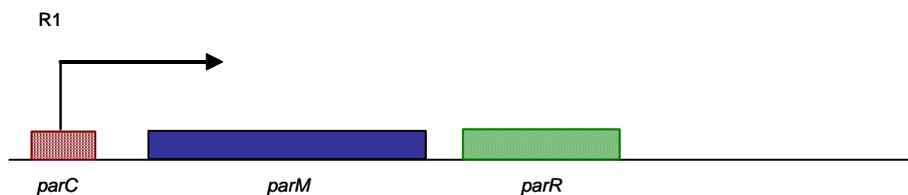
El sistema de partición del plásmido **P1** está controlado por sus genes *parA* y *parB*, los cuales se organizan en operones autorregulados aguas arriba de los centrómeros de unión llamados *parS* (Figura 1.12). Inicialmente, la proteína ParB se asocia al sitio *parS*, reconociendo dos motivos de unión distintos: la caja A y la caja B. Cabe destacar que, en este paso, interviene también la proteína IHF la cual incrementa la afinidad de ParB por *parS* (Funnell, 1991). Seguidamente, a este complejo mínimo de unión se unen nuevos dímeros de ParB. El papel exacto de la proteína ParA no se conoce, si bien se han sugerido las siguientes funciones: (i) anclaje de los plásmidos en uno o varios lugares de la membrana celular; (ii) liberación de las proteínas IHF de sus lugares de unión al plásmido; (iii) estimulación de la separación de las agrupaciones plasmídicas mediadas por ParB e (iv) inhibición del complejo de partición en los polos y en el centro de la célula. Para todas estas funciones, ParA funciona como una ATPasa, por lo que la hidrólisis del ATP es esencial (Davis *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1992).



**Figura 1.12.** Organización genética de los *loci* de partición de los plásmidos P1 y F. Adaptado de Funnell y Slavcev (2004).

Una característica importante del plásmido P1, que también se mantiene en el plásmido F, es la proteína ParA, conocida como SopA en este último. Esta proteína actúa como represor asociándose a su operador. ParB y su homóloga en F, SopB, estimulan dicha represión (Mori *et al.*, 1986; Friedman y Austin, 1988).

El plásmido **R1** tiene un sistema de partición que se caracteriza por la existencia de una ATPasa, denominada ParM, perteneciente a la superfamilia de ATPasas, en la que se incluye también a la actina de mamíferos y a la proteína bacteriana, MreB (Gerdes *et al.*, 2000). Recientes estudios han confirmado que la estructura y las propiedades de ParM son similares a las de la actina F (van den Ent *et al.*, 2002). Esta es la característica más importante para explicar este modelo de partición. El *locus* de partición de R1 está organizado en forma de un operón y contiene los genes *parM* y *parR*. Este último gen codifica la proteína de unión al centrómero (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Organización genética del *loci* de partición del plásmido R1. Adaptado de Funnell y Slavcev (2004).

El sitio de unión se denomina *parC* y contiene 10 secuencias repetidas que separan la región promotora de la operadora. ParR actúa como represor del operón *par* y además desarrolla un papel en la partición. El sistema de R1 es el único en el que el apareamiento

plasmídico se ha demostrado *in vitro* utilizando un ensayo de ligación y de microscopía electrónica (Jensen *et al.*, 1998). El apareamiento por los lugares *parC* está mediado por ParR y es estimulado por ParM en presencia de ATP.

Datos bioquímicos y estructurales recientes muestran que ParM se comporta como lo hace la actina, es decir, forma filamentos dinámicos que crecen y se acortan con la unión e hidrólisis del ATP. En este modelo de partición, la agrupación de los plásmidos se realiza gracias a los complejos ParR-*parC*. La posterior interacción con ParM estimula la filamentación que separa y conduce a los plásmidos a lugares opuestos dentro de una célula, asegurándose así la herencia plasmídica a cada una de las células hijas (Funnell y Slavcew, 2004).

### **1.5.2 Caracterización del grupo de incompatibilidad**

El estudio de los plásmidos comenzó a ser importante a finales de la década de los 50, después del descubrimiento de los plásmidos R y del reconocimiento de su amplia distribución. Hasta ese momento, los trabajos realizados estaban dirigidos al plásmido F y a sus funciones en la transferencia de genes y a los plásmidos colicinogénicos (Col) (Couturier *et al.*, 1988). El reconocimiento de genes de resistencia a antibióticos en los plásmidos R se llevó a cabo tras comprobar que estos genes podían ser transferidos por conjugación. Así, el primer criterio utilizado para la clasificación plasmídica estuvo basado en la capacidad de transferencia por conjugación (Couturier *et al.*, 1988). Posteriormente, se observó que, en ocasiones, ciertos plásmidos R eran capaces de inhibir la transferencia de un plásmido F cuando ambos coexistían en la misma célula. Watanabe utilizó esa diferencia para proponer una segunda clasificación de los plásmidos en  $fi^+$  (inhibición positiva de fertilidad) y  $fi^-$  (inhibición negativa de fertilidad) (Watanabe, 1969). El número creciente de plásmidos descubiertos en la década de los 60 que no encajaban en las clasificaciones realizadas hasta el momento por ser no conjugativos, no inhibir la transferencia por conjugación o bien disponer de nuevos tipos de pili (Datta, 1975), hizo necesario el desarrollo de otros métodos de clasificación, los cuales se comentan a continuación.

### **i. Transferencia plasmídica**

Se basó en la introducción por conjugación, transducción o transformación de un plásmido en una cepa portadora de otro plásmido cuyo grupo de incompatibilidad era conocido. Si el plásmido introducido era eliminado, ambos plásmidos eran incompatibles y se asignaban al mismo grupo de incompatibilidad (Grant y Pittard, 1974). En la actualidad, es un método que sigue utilizándose en casos concretos, combinado con otros métodos (Smalla *et al.*, 2000; Haines *et al.*, 2006). La incapacidad de ciertos plásmidos para transferirse o bien el hecho de que algunos de ellos no fueran portadores de marcadores seleccionables fueron algunas de las complicaciones derivadas de esta técnica. Otro problema técnico fue la exclusión de superficie, fenómeno que impide la entrada de un segundo plásmido, y que era difícil de distinguir del propio efecto de la incompatibilidad (Couturier *et al.*, 1988).

Los problemas metodológicos de esta técnica dieron lugar a la aparición de grupos de incompatibilidad que realmente no existían. Este hecho puede observarse claramente en los plásmidos multirreplicón, ya que cuando se utiliza uno de estos plásmidos como residente en una bacteria receptora, no se elimina a un segundo plásmido que tenga un replicón igual a alguno de los que contenga el multirreplicón. De la misma manera, cambios puntuales en el inhibidor de la replicación o bien en su diana, alteran la incompatibilidad, haciendo pensar que estos replicones pertenecen a un grupo de incompatibilidad diferente. Todas estas situaciones generaron un esquema de incompatibilidad muy complicado y extenso (Couturier *et al.*, 1988).

### **ii. Tipificación de replicones plasmídicos por hibridación de DNA**

El grupo de M. Couturier desarrolló en 1988 un método basado en la hibridación del DNA plasmídico con una colección de sondas específicas, derivadas de diecinueve de los replicones plasmídicos más frecuentes en enterobacterias y en *Pseudomonas*. Dichas sondas contienen al menos uno de los determinantes de incompatibilidad asociados a las funciones de replicación o partición.

Las diecinueve sondas fueron aisladas de plásmidos pertenecientes a diecisiete grupos de incompatibilidad. Tres de ellas, *repFIA*, *repFIB* y *repFIC* procedieron de tres replicones

encontrados en plásmidos del grupo IncFI. Las dieciséis sondas restantes contenían los replicones FIIA, com9, I1, B/O, K, HI1, HI2, L/M, N, P, Q, T, U, W, X e Y y se aislaron de plásmidos tipo de cada grupo de incompatibilidad (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4.** Características de las sondas utilizadas para la identificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos de enterobacterias.

Plásmido	Sonda	Origen sonda	Grupo Inc	Tamaño sonda	Sitios de clonación	Resistencia del vector
pULB2154	repFIA	F	IncFI	917	<i>EcoRI</i>	Tc
pULB2404	repFIB	P307	IncFI	1,202	<i>PstI</i>	Tc
pULB2440	repFIC	P307	IncFI	967	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Ap
pULB2401	repFIIA	R1 <i>drd-19</i>	IncFII	543	<i>PstI</i>	Tc
pULB2422	rep9	pIP71	com9	539	<i>PstI</i>	Tc
pULB2428	repI1	R64 <i>drd-11</i>	IncI1	1,100	<i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>	Tc
pULB2406	repB/O	pMU700	IncB/O	1,600	<i>PstI</i>	Tc
pULB2439	repK	R387	IncK	1,000	<i>BamHI</i> + <i>SalI</i>	Ap
pULB2436	repHI1	TR6	IncHI1	2,250	<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	Ap
pULB2433	repHI2	TP116	IncHI2	1,800	<i>EcoRI</i>	Ap, Tc
pULB2423	repL/M	pMU407.1	IncL/M	800	<i>PstI</i>	Tc
pULB2432	repN	R46	IncN	1,000	<i>EcoRI</i>	Ap, Tc
pULB2420	repP	RK2	IncP	750	<i>HaeII</i>	Km
pULB2424	repQ	R1162	IncQ	357	<i>EcoRI</i>	Ap, Tc
pULB2425	repT	Rts1	IncT	304	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	Ap
pULB2429	repU	RA3	IncU	950	<i>EcoRI</i>	Tc
pULB2426	repW	RSa	IncW	1,150	<i>EcoRI</i>	Tc
pULB2405	repX	R6K	IncX	942	<i>HindIII</i>	Ap
pULB2410	repY	P1	IncY	1,245	<i>HindIII</i>	Ap

Trece de estas diecinueve sondas son específicas ya que hibridan solamente con plásmidos de un único grupo de incompatibilidad. Sin embargo, dos series de sondas que comparten regiones muy similares dan lugar a hibridación cruzada. La sonda *repFIIA* hibrida con los plásmidos pertenecientes a los grupos IncFII, IncFIC y com9 y la sonda *repI1* con los plásmidos de los grupos IncFIC, IncB/O, IncI1 e IncK. Los análisis de las secuencias de estas sondas indican que contienen regiones de DNA con un alto porcentaje de similitud entre ellas y el *locus inc* del replicón FIIA del plásmido R100. Esto llevó a pensar que podía existir una posible relación filogenética entre estos replicones, sugiriéndose una evolución a partir de un ancestro común que por mutación habría dado lugar a todos estos nuevos grupos de incompatibilidad. Por ello, estas seis sondas hibridan con plásmidos de una misma familia de replicones, la llamada familia RepFIC (Saadi *et al.*, 1987). De igual forma, algunos plásmidos IncHI2 son reconocidos por la sonda *repHI1*, por lo que se ha sugerido la presencia de elementos de replicación y de partición similares en ambos grupos Inc.

Esta técnica, basada en la hibridación DNA-DNA, ha facilitado enormemente la identificación y clasificación plasmídica (Chaslus-Dancla *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1993; Gstalder *et al.*, 2003). No obstante, las hibridaciones cruzadas que enmascaran los resultados finales y que impiden discernir entre grupos filogenéticos cercanos, la existencia de plásmidos multirreplíción y la falta de sondas para identificar todos los grupos Inc conocidos son los principales problemas de este procedimiento, lo cual ha conducido a la búsqueda de nuevos métodos de caracterización de la incompatibilidad plasmídica.

### **iii. Tipificación mediante la técnica de amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La aplicación de la técnica de PCR en el tipado de los plásmidos fue desarrollada por A. Götz en 1996. Posteriores estudios avalan el desarrollo de nuevos cebadores específicos para la detección de las zonas de replicación plasmídica (Sobecky *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000; Smalla *et al.*, 2000; Sherley *et al.*, 2003; Starčič Erjavec *et al.*, 2003; Carattoli *et al.*, 2005b). Sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes como los debidos a las variaciones en las secuencias de unión de los cebadores fruto de la evolución que sufren los replicones. De hecho, Götz y colaboradores describen resultados negativos en el tipado del grupo Inc por la técnica de PCR y positivos por hibridación. Otros problemas ponen de manifiesto que la especificidad que se consigue mediante la técnica de PCR con cebadores específicos en plásmidos tipo con grupo Inc conocido, no se mantiene en plásmidos procedentes de cepas de campo (Carattoli *et al.*, 2005b). El desarrollo de cebadores específicos continúa siendo hoy en día problemático, sobre todo en el caso de los grupos Inc pertenecientes a la familia RepFIC, ya que la alta similitud de sus secuencias impide el desarrollo de cebadores capaces de diferenciar por ejemplo a los grupos IncFII y com9.

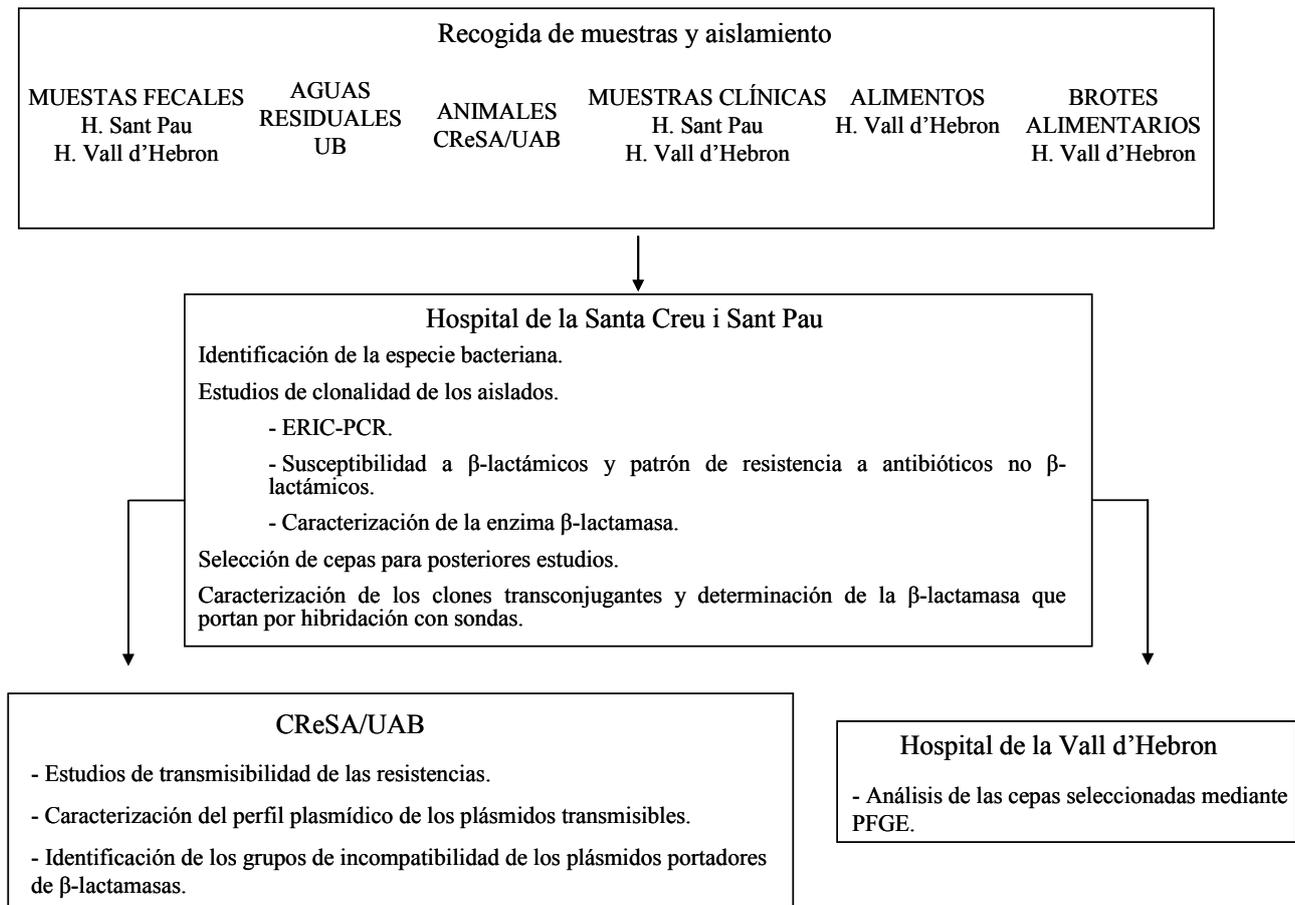
## **1.6 OBJETIVOS**

Uno de los principales problemas en clínica humana y veterinaria es la multirresistencia a los antimicrobianos que presentan muchas bacterias causantes de infecciones. Las dificultades en el tratamiento de estas enfermedades radica en que muchos patógenos sintetizan unas enzimas conocidas como  $\beta$ -lactamasas, las cuales son capaces de hidrolizar a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, antimicrobianos ampliamente usados por su alta eficacia y baja toxicidad. La evolución de estas enzimas ha dado lugar a la aparición de otras con un espectro tan amplio y devastador como son las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido (BLEE), las cefamicinasas y las carbapenemasas de las bacterias gramnegativas (Livermore, 1995).

En la actualidad, los datos que se conocen sobre la prevalencia de estas enzimas en cepas de origen extrahospitalario apuntan a la existencia de una subpoblación latente de cepas portadoras en la población sana. No obstante, existe un considerable desconocimiento sobre la prevalencia de cepas portadoras de BLEE, cefamicinasas y carbapenemasas en otros ambientes. Uno de los hábitats más indocumentado y a la vez más susceptibles de ser reservorio de este tipo de enzimas, son los animales de granja, los cuales a su vez podrían difundir estas resistencias a la población humana vía alimentos. El discernimiento de los reservorios, la caracterización de nuevas enzimas y la trazabilidad de los mecanismos de difusión son elementos imprescindibles para atajar su expansión y mejorar el tratamiento de las infecciones.

La presente memoria se enmarca en un proyecto coordinado, cuyo principal objetivo ha sido determinar la prevalencia de enterobacterias portadoras de BLEE,  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C (cefamicinasas) y carbapenemasas en diferentes ambientes (animales, alimentos, aguas residuales y humanos), así como vislumbrar los factores que la justifican.

El trabajo coordinado se representa en el siguiente organigrama.



En este marco, los objetivos parciales de la presente Tesis han sido los siguientes:

- Determinación de la prevalencia de enterobacterias portadoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido,  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C (cefamicinas) y carbapenemasas en granjas de animales.
- Caracterización del grupo filogenético e identificación de determinantes de virulencia de las cepas de *Escherichia coli*, aisladas de granjas de animales.
- Caracterización de los plásmidos portadores de las  $\beta$ -lactamasas objeto de estudio, presentes en cepas representativas de los diferentes ambientes estudiados.

## ***2. MATERIAL y MÉTODOS***

---

## 2. MATERIAL y MÉTODOS

### 2.1 Muestreo y aislamiento de enterobacterias portadoras de $\beta$ -lactamasas

Un total de diez granjas de cerdos, diez de aves y diez de conejos fueron objeto de estudio. Dichas granjas son representativas de diversas áreas geográficas de Catalunya y fueron seleccionadas por el Servei de Veterinària del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. No se tiene conocimiento de que en ninguna de ellas se presentaran brotes infecciosos, ni tampoco información de la presencia de animales enfermos. De cada una de las granjas se tomaron diez muestras de 10 g del lecho y materia fecal, se homogenizaron cada una de ellas en 90 ml de agua peptonada y se sembraron alícuotas de 0,1 ml en agar MacConkey suplementado con 2 mg/l de cefotaxima o con 4 mg/l de imipenem. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C en condiciones anaeróbicas para evitar el crecimiento de bacterias gramnegativas no fermentadoras. En los casos en que fue posible, se aislaron tres colonias de cada una de las morfologías observadas para su posterior estudio. Este trabajo fue realizado por el Laboratori de Sanitat Animal del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Los aislados fueron definidos como productores de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas al mostrar un patrón compatible con las cefamicinasas o BLEE. La clonalidad de los aislados se estudió mediante ERIC-PCR y macrorrestricción genómica con la enzima *XbaI* mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE). Las cepas no clonales fueron sometidas a estudios de sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y no  $\beta$ -lactámicos mediante la técnica de disco difusión en medio con agar Müller-Hinton, siguiendo las recomendaciones del CLSI. La identificación a nivel de especie se realizó según lo descrito en Farmer III, (2003). Las enzimas específicas objeto de estudio se identificaron por isoelectroenfoque y finalmente por secuenciación. En la caracterización de las cefamicinasas plasmídicas se empleó como técnica presuntiva la descrita por Mirelis *et al.*, (2006) y como método definitivo la secuenciación. Las cepas productoras de enzimas AmpC cromosómicas e inducibles que se detectaron tal y como se describe en Mirelis *et al.*, (2006), fueron eliminadas del estudio. Las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y ATCC

35218 fueron utilizadas como controles. Estos estudios fueron realizados por los Serveis de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y de l'Hospital de la Vall d'Hebron.

## 2.2 Cepas bacterianas, bacteriófagos y plásmidos

Las características más destacables de las cepas bacterianas y de los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en las siguientes tablas.

**Tabla 2.1.** Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepas	Características relevantes	Procedencia
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE4 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech
DSM5698	Portadora del plasmido P1	DSMZ
HB101	<i>thi-1 supE44 hsdS20 (rB<sup>-</sup>, mB<sup>-</sup>) recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Clontech
UA6189	HB101, AZ <sup>R</sup>	Este trabajo
UA6190	HB101, GFP, RIF <sup>R</sup> GEN <sup>R</sup> KAN <sup>R</sup>	Este trabajo
K-12 CGSC5073	<i>rfb50</i> . Portadora del plásmido F1-1	CGSC
EcoR16	A <sub>1</sub>	G. Prats
EcoR1	A <sub>2</sub>	G. Prats
EcoR30	B <sub>1</sub>	G. Prats
<i>E. coli</i> 35a	B <sub>2</sub> <sup>2</sup>	G. Prats
EcoR65	B <sub>2</sub> <sup>3</sup>	G. Prats
EcoR39	D <sub>1</sub>	G. Prats
J96	Portadora de los genes <i>sfa/foc, papC, papAH, hlyA</i>	G. Prats
CCUG31249	Portadora del gen <i>kpsM II</i>	G. Prats
CFT073	Portadora de los genes <i>iutA, irp2, tsh, malX</i>	G. Prats
FV35	Portadora del gen <i>afa/dra</i>	G. Prats
K-12 MG1655	<i>ilvG rfb50 rph1</i> . Portadora de los genes <i>cgsA, crl</i>	G. Prats
EcoR30	Portadora de los genes <i>iss, fimC, iroC</i>	G. Prats
EcoR39	Portadora del gen <i>iucD</i>	G. Prats
EcoR16	Portadora de los genes <i>fyuA</i>	G. Prats
<i>S. enterica</i> serovar Enteritidis		
UA4120	<i>F- supE44 thr-1 leu6 proA2 his4 argE3 thi-1 lacY1 galK2 ara14 xyl5 ntl1 tsx33 STR<sup>R</sup> / Portadora del plásmido pKM101 AMP<sup>R</sup></i>	Este laboratorio

Las cepas UA6189 y UA6190 se utilizaron como receptoras en las conjugaciones biparentales. La primera de ellas se utilizó en los casos en los que la cepa donadora fue resistente a los aminoglicósidos y la segunda en los casos restantes. La comprobación del fenotipo de los transconjugantes obtenidos desde la cepa UA6189 se llevó a cabo sembrándolos en placas de medio mínimo suplementado con tiamina, leucina y prolina y en el mismo medio adicionando un único suplemento. En los casos en que la cepa receptora empleada fue la UA6190, los transconjugantes se detectaron por crecer en placas selectivas y por emitir fluorescencia al irradiarlos con luz ultravioleta (UV) a 302 nm con un transiluminador UVP. En la Tabla 2.1 se presentan también las cepas utilizadas como controles para la determinación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D de *E. coli*, así como para la identificación de los genes de virulencia.

**Tabla 2.2.** Plásmidos empleados en el presente trabajo.

Plásmidos	Características relevantes	Procedencia
pULB2154	IncFI TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2401	IncFII TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2404	IncFI TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2405	IncX AMP <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2420	IncP KAN <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2423	IncL/M TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2424	IncQ AMP <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	A. Toukdarian
pULB2426	IncW TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2428	IncI1 TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2429	IncU TET <sup>R</sup>	A. Toukdarian
pULB2433	IncHI2 AMP <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	M. Couturier
pULB2436	IncHI1 AMP <sup>R</sup>	M. Couturier
pUA1093	IncN pGEM <sup>®</sup> -T con un fragmento del pKM101 AMP <sup>R</sup>	Este trabajo
pUA1094	IncY pGEM <sup>®</sup> -T con un fragmento del P1 AMP <sup>R</sup>	Este trabajo
plásmido FrepB	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repFIIA	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repFIC	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repI1	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repB/O	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repK	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli
plásmido repA/C	AMP <sup>R</sup> NAL <sup>R</sup>	A. Carattoli

En la Tabla 2.2 se presentan los plásmidos empleados en la obtención de las regiones de incompatibilidad plasmídica estudiadas y también como controles positivos en los experimentos de PCR para identificar algunos grupos de incompatibilidad.

El bacteriófago P1 se empleó para obtener la región determinante del grupo de incompatibilidad plasmídica Y.

### 2.3 Métodos de recuento y obtención de los lisados fágicos

Para calcular el número de **células viables** se realizaron diluciones seriadas de un cultivo de noche en medio líquido LB y 100 µl de la dilución deseada se sembraron en placas de medio agar LB. Tras incubar a 37°C durante 18 h, se procedió al recuento de las colonias. Los resultados se expresaron en cfu/ml.

Para **incrementar el título del fago P1** se preparó un cultivo de noche de la cepa de *E. coli* CGSC5073 en medio líquido LB y se incubó a 37°C durante 18 h en agitación. Posteriormente, se realizó la siguiente mezcla en tubos de plástico: 2,5 ml de LB agar blando (0,7%), mantenido a 45°C, 100 µl del cultivo de noche y 100 µl del lisado fágico obtenido a partir de una calva. Tras mezclar por inversión, la mezcla se dispensó en placas de LB que se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h. Pasado ese tiempo, se añadieron 3 ml de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (véase anexo I) a cada placa y se dejaron 30 min en agitación suave a 4°C, para permitir la suspensión de los fagos. Esta suspensión se recuperó con ayuda de una micropipeta y de un asa de Digralsky y se depositó en un tubo de plástico químicamente inerte, el cual se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 min para sedimentar las bacterias. El sobrenadante que contenía las partículas fágicas se trató con cloroformo para eliminar las bacterias. Los tubos se centrifugaron de nuevo a 8.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo, el cual se guardó a 4°C.

La **concentración de los fagos** se determinó mediante una titulación, preparando un cultivo de noche de la cepa indicadora *E. coli* CGSC5073. Una vez crecida, se añadieron a un tubo de 2,5 ml de LB blando (0,7%), fundido y mantenido a 45°C, 100 µl del cultivo y 100 µl de las diluciones seriadas del lisado fágico en MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Las placas se

sembraron e incubaron como se ha descrito anteriormente. Las calvas aparecidas en las placas se contaron y los resultados se expresaron en pfu/ml.

## 2.4 Serotipado

El serogrupo de las cepas de *E. coli* caracterizadas como ExPEC procedentes de granjas de animales se realizó según lo descrito en Blanco *et al.*, (1992) y fue realizada por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) en España (Lugo) (<http://www.lugo.usc.es/ecoli>)

## 2.5 Métodos genéticos

### 2.5.1 Transformación por electroporación

Se empleó la técnica descrita por Dower *et al.*, (1988) con leves modificaciones. Se utilizaron los aparatos *Gene pulser II* i *Pulse Controller Electroporation System* de BioRad Laboratories y los protocolos recomendados por el fabricante. Este método se basa en someter las células competentes a un pulso corto de corriente eléctrica de alto voltaje. Ello comporta la alteración de las envueltas celulares y la formación de canales transitorios por donde es introducido el DNA plasmídico (Shigekawa y Dower, 1988).

#### 2.5.1.1 Inducción de la competencia en *E. coli* DH5 $\alpha$

- Inocular 10 ml de un cultivo de noche a 1 l de LB (NaCl a una concentración final del 0,5%).
- Incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,6.
- Enfriar el cultivo a 4°C durante 15 min. Es necesario enfriar también todo el material y líquidos que entrarán en contacto con las células.
- Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q estéril y fría (mismo volumen que el del medio).
- Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Repetir el proceso de lavado anterior una vez más.

- Posteriormente, resuspender el sedimento en 20 ml de glicerol 10% (Véase anexo I I) estéril y frío.
- Centrifugar a 9.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de glicerol 10% estéril y frío.
- Transferir volúmenes de 50 µl a tubos de microcentrífuga y congelar rápidamente en nieve carbónica.
- Guardar a -70°C.

En el momento de realizar la transformación se debe:

- Añadir el DNA transformante a un vial de 50 µl de células competentes descongeladas y mantenidas a 0°C.
- Incubar la mezcla a 0°C durante 5 min. Pasado ese tiempo, transferir la mezcla a una cubeta de electroporación de 2 mm de grosor.
- Realizar la descarga a temperatura ambiente en las siguientes condiciones:

Modo	2 kV/cm <sup>2</sup>
Capacitancia	125 µF
Resistencia en paralelo	200 Ω

- Una vez realizada la descarga, transferir las células a un tubo de vidrio de 18x con 1 ml de medio BHI (véase anexo I) sin antibiótico e incubar a 37°C en agitación durante 45 min, tiempo necesario para que se produzca la expresión fenotípica de los genes de resistencia a antibióticos.
- Seleccionar las células que han incorporado el DNA, sembrando 100 µl del cultivo en placas de LB con el antibiótico de selección de los transformantes e incubar a 37°C durante 16 h.

### 2.5.2 Conjugación en medio sólido

La conjugación se llevó a cabo según lo descrito en Cárdenas *et al.*, (2001), de la siguiente manera:

- Realizar un cultivo de noche de las cepas receptora (sin antibiótico) y donadora (con antibiótico).
- Al día siguiente realizar una resiembra (dil 1/50) de la cepa donadora en medio sin antibiótico e incubar a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0,8.
- Mezclar en un tubo de microcentrífuga una alícuota de 0,5 ml del cultivo de la cepa donadora con 0,5 ml del cultivo de noche de la cepa receptora.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
- Desechar 900 µl del sobrenadante.
- Disponer el sedimento resuspendido, en los 100 µl restantes de sobrenadante, sobre un filtro estéril de 0,45 µm de tamaño medio de poro (Millipore) colocado en una placa de medio sólido LB sin antibiótico.
- Incubar durante toda la noche a 37°C.
- Depositar el filtro en tubos de plástico de 5 ml, químicamente inertes, con 1 ml de medio líquido LB y agitar. Preparar diluciones seriadas (1/10) de esta suspensión en este mismo medio.
- Sembrar 0,1 ml de cada una de las diluciones en placas de LB con los antibióticos idóneos para seleccionar el fenotipo de los transconjugantes.
- Utilizar como controles las cepas donadora y receptora. Para ello, tomar 500 µl de cultivo y centrifugarlos a 13.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
- Desechar los primeros 400 µl del sobrenadante y depositar los 100 µl restantes en un filtro.
- Incubar en las mismas condiciones descritas anteriormente.
- Realizar la siembra directamente con 100 µl del filtro resuspendido en las placas de selección.

De cada experimento de conjugación, se aislaron tres clones al azar y se estudió su patrón de resistencia a los antibióticos no β-lactámicos. Se seleccionó para posteriores un clon transconjugante por cada cepa donadora si los tres seleccionados presentaban el mismo patrón de resistencia y todos los clones que a pesar de proceder de la misma cepa donadora mostraban patrones de resistencia diferentes. Posteriormente se caracterizó la enzima β-lactamasa de los transconjugantes escogidos.

## 2.6 Métodos de DNA

### 2.6.1 Extracción de DNA

#### 2.6.1.1 Extracción de DNA total desde colonia (Liebana *et al.*, 2002)

- Resuspender una colonia de un cultivo fresco en 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q estéril.
- Llevar la suspensión a 100°C en un baño durante 10 min.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, recuperar el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo.
- Guardar los lisados celulares a - 20°C hasta el momento de su utilización.

#### 2.6.1.2 Extracción de DNA cromosómico desde cultivo líquido (Sambrook *et al.*, 1989)

El protocolo se describe para pequeños volúmenes de cultivo. El procedimiento empleado se basa en la lisis celular mediada por detergentes (SDS 10%) y proteinasa K, seguida de una incubación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que secuestra a los polisacáridos y a las proteínas. Posteriormente, se hacen lavados con fenol-cloroformo (1:1) para eliminar los restos proteicos y con cloroformo/isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol.

- Centrifugar 1,5 ml de un cultivo de noche a 13.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 567 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q más 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (véase anexo I) y 30 µl de SDS 10% (véase anexo I).
- Incubar la mezcla durante 1 h a 37°C.
- Añadir 100 µl de NaCl 5 M (AppliChem), agitar vigorosamente la mezcla y añadir 80 µl de CTAB/NaCl (véase anexo I) previamente atemperado a 65°C.
- Incubar la mezcla durante 10 min a 65°C.
- A partir de este paso, trabajar con puntas de micropipeta cortadas, para evitar la rotura de las hebras de DNA por el pipeteo.

- Hacer varios lavados de fenol-cloroformo (1:1) (véase anexo I) y un lavado final con cloroformo/isoamílico (24:1) (véase anexo I).
- Recuperar la fase superior en un nuevo tubo y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol (Panreac). Observar la formación de hilos de DNA.
- Precipitar el DNA por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Lavar el sedimento de DNA añadiendo 1 ml de etanol al 70% (véase anexo I).
- Secar con una bomba de vacío (Speed Vac<sup>®</sup>, Savant) y resuspender en 100 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) (véase anexo I) con RNasaI (1 mg/ml).
- Guardar a -20°C.

### 2.6.1.3 Extracción de DNA fágico

Este procedimiento se llevó a cabo tal y como se describe en Sambrook *et al.*, (1989) con ligeras modificaciones, las cuales se describen en el siguiente protocolo.

- Tomar 10 ml de un lisado fágico con una titulación de  $10^{11}$  pfu/ml y añadir 10 µl de una solución estoc de *DNasaI RNase-free DNaseI* (10 U/µl) (Roche Diagnostics SL)] y 10 µl de la solución RNasaI (20 mg/ml) (véase anexo I).
- Agitar suavemente la mezcla por inversión y dejar actuar durante 1 h a 37°C. En este tratamiento se degradarán el DNA y el RNA bacteriano que reste en la suspensión, observándose una disminución de la viscosidad.
- Centrifugar a 27.000 rpm durante 90 min 4°C, utilizando una ultracentrífuga Beckmann con un rotor Ti 80.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el sedimento, que deber ser translúcido, en 500 µl de Tris-HCl 0,05 M a pH 8 (AppliChem).
- Transferir la solución a un tubo de microcentrífuga y añadir 500 µl de una solución de fenol/cloroformo (1:1) (véase anexo I). Esta solución desnaturaliza las cápsides y libera el DNA fágico. Las proteínas de la cápside se observan como un precipitado blanco en la interfase.
- Agitar el tubo con ayuda de un agitador durante 20 min. La agitación deberá ser vigorosa debido a la dificultad de resuspensión del sedimento.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min, recuperar la fase acuosa y pasarla a un nuevo tubo.

- Realizar un nuevo lavado con fenol/cloroformo (1:1). El número de lavados con esta solución dependerá de la turbidez del sobrenadante una vez centrifugado.
- Recuperar la fase superior y añadir 200 µl de cloroformo/isoamílico (24:1) (véase anexo I).
- Agitar vigorosamente por inversión y centrifugar 5 min a temperatura ambiente.
- Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo.
- Añadir 20 µl de acetato sódico 3 M a pH 4,8 (véase anexo I) y dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1 ml de etanol al 70% (véase anexo I).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y secar el sedimento con ayuda de una bomba de vacío (Speed Vac<sup>®</sup>, Savant).
- Resuspender el DNA fágico con tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) (véase anexo I) con RNasa I (1 mg/ml).
- Guardar a -20°C.

#### **2.6.1.4 Miniextracción de DNA plasmídico**

El protocolo que se detalla a continuación es una modificación del descrito por Birnboim y Doly (1979), basado en la lisis alcalina y en la eliminación de proteínas por fenol/cloroformo.

- Partir de cultivos de noche en 3 ml de medio líquido TB (véase anexo I).
- Precipitar las células por centrifugación en un tubo de microcentrífuga a 13.000 rpm a temperatura ambiente y resuspender el sedimento con 100 µl de solución I fría (véase anexo I).
- Realizar la lisis añadiendo 200 µl de solución II (véase anexo I) y agitar suavemente.
- Mantener los tubos a 0°C durante 5 min.
- Pasado ese tiempo, neutralizar la suspensión añadiendo 150 µl de solución III (véase anexo I).

- Incubar 10 min a 0°C. En este punto, observar la aparición de precipitados blancos y una clarificación de la suspensión.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante en un nuevo tubo y realizar varios lavados con fenol-cloroformo (1:1) (véase anexo I) y un lavado final con cloroformo/isoamílico (24:1) (véase anexo I).
- Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y precipitar el DNA con 1 ml de etanol absoluto (Panreac).
- Incubar a -70°C durante un mínimo de 30 min.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C y lavar el precipitado con 1 ml de etanol al 70% (véase anexo I).
- Centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior.
- Secar el sedimento con ayuda de una bomba de vacío (Speed Vac<sup>®</sup>, Savant) y resuspender el sedimento en 20-25 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM) con RNasaI (1 mg/ml).
- Guardar a -20°C.

#### **2.6.1.5 Extracción de DNA plasmídico**

Para realizar las extracciones de DNA plasmídico desde cultivos líquidos de gran volumen se utilizó el kit QIAGEN Plasmid Midi de Qiagen. Este protocolo se basa en una lisis alcalina con leves modificaciones, seguida de la unión del DNA plasmídico a una resina de intercambio aniónico a baja concentración salina y a pH ácido. El DNA plasmídico es eluido con un tampón de alta concentración salina. No obstante, aún siguiendo las recomendaciones del protocolo, se realizaron las siguientes modificaciones.

- Partir de un cultivo líquido en LB de 500 ml de la cepa deseada.
- Utilizar un volumen de 20 ml de los tampones P1, P2 y P3.

#### **2.6.1.6 Extracción de DNA para PFGE (Smith *et al.*, 1988)**

- Inocular 1 ó 2 colonias desde cultivos frescos en 20 ml de medio LB líquido suplementado adecuadamente.

- Incubar durante 18 h a 37°C en agitación.
- Ajustar la DO<sub>450</sub> a 0,6-0,7.
- Transferir 10 ml del cultivo a un tubo de plástico, químicamente inerte y centrifugar a 6.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El diámetro del sedimento debe ser de 0,5-0,7 cm.
- Resuspender el sedimento en 8 ml de tampón PET IV (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 1M) (véase anexo I). Centrifugar durante 10 min a 6.000 rpm a temperatura ambiente.
- Repetir el paso anterior una o dos veces más.
- Resuspender el sedimento y ajustar el volumen final a 1 ml con PET IV.
- Limpiar los moldes para la formación de los insertos (Amersham Biosciences) con etanol absoluto y H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q (Carlo Erba Reagenti), por este orden.
- Dejar secar y sellar la parte inferior con cinta adhesiva transparente.
- Preparar la cantidad de agarosa de bajo punto de fusión (Incert agarose, FMC Bioproducts) necesaria para obtener una concentración final del 0,8%. Dado que la relación agarosa-muestra es de 1:1 (v/v), al diluirse a la mitad se necesitará preparar la agarosa al 1,6%. Normalmente, se preparan 5 insertos por muestra y cada inserto tiene un volumen total de 100 µl. Por tanto, se necesitan 500 µl de volumen total por muestra a realizar, de los cuales 250 µl serán de agarosa al 1,6%.
- Disolver la agarosa en H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q estéril con calor y mantenerla a una temperatura de 45-50°C.
- Transferir 250 µl de la suspensión celular, resuspendida en PET IV (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; NaCl 1 M), a un tubo de microcentrífuga y añadir 250 µl de agarosa atemperada a 45-55°C.
- Homogeneizar la mezcla y, sin dejar que se enfríe, dispensar 100 µl en cada bloque del molde.
- Dejar los moldes a 4°C para permitir la solidificación de la agarosa durante un tiempo aproximado de 1 ó 2 h.
- Sacar los insertos del molde. Para ello, retirar la cinta adhesiva y con la ayuda de una pera de goma ejercer presión en la parte superior para que el inserto salga. Transferirlo a un tubo con 2 ml de Tampón de lisis I (véase anexo I), añadiendo lisozima (1 mg/ml) (Roche Diagnostics SL) (véase anexo I) y RNasaI (2 µg/ml).

- Incubar durante 24 h a 37°C.
- Retirar el tampón de los tubos y añadir 2 ml de Tampón de lisis II (véase anexo I) y Pronasa (1 mg/ml) (Roche Diagnostics SL) (véase anexo I).
- Incubar 48 h a 50°C.
- Guardar a 4°C.

Los insertos pueden guardarse en esta solución durante aproximadamente 1 año.

### 2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la obtención de las sondas determinantes de la incompatibilidad plasmídica se empleó el *kit* comercial *Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics SL). La cantidad de molde de DNA de los plásmidos tipo, portadores de las secuencias *inc/rep*, fue de 200 ng. Todos los experimentos de PCR se realizaron en una cámara de flujo vertical para PCR (FLV60 Euro Aire), irradiando todo el material utilizado con luz ultravioleta durante 20 min. La reacción se realizó en un tubo de 0,5 ml de capacidad y la mezcla utilizada fue la siguiente:

Volumen final	25 µl
- Tampón 10x de PCR (Roche Diagnostics SL)	2,5 µl
- Mezcla de dNTPs (1 mM cada dNTP) (Roche Diagnostics SL)	2,5 µl
- Cebador directo (10 pmol/ µl) (Roche Diagnostics SL)	1,25 µl
- Cebador reverso (10 pmol/ µl) (Roche Diagnostics SL)	1,25 µl
- Enzima <i>Expand High Fidelity</i> (3,5 U/ µl) (Roche Diagnostics SL)	0,2 µl
- DNA plasmídico (molde)	200 ng
- H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q estéril	hasta 25 µl

El termociclador utilizado fue Mastercycler<sup>®</sup> personal 5332 (Eppendorf) y el programa empleado fue el siguiente:

Temperatura	Proceso	Tiempo (min)	no. ciclos
95°C	Desnaturalización	5	1
95°C	Desnaturalización	1	
Tª hibridación	(según los cebadores)	1	30
72°C	Extensión	según el tamaño del fragmento (1 min/ kb)	
72°C	Extensión final	7	1

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (véase apartado 2.6.6).

Para la amplificación de los fragmentos portadores de las funciones determinantes de la incompatibilidad plasmídica se diseñaron dos tipos de cebadores. Los primeros son los cebadores complementarios al lugar de clonación de las secuencias *inc/rep* en los plásmidos tipo (EcoRI dir 5'-CCTGACGTCTAAGAAACC-3'; EcoRI rv TCGATGATAAGCTGTCAAAC; PstI dir 5'-TTTGCGCAACGTGTTGCC-3'; PstI rv AATGAAGCCATACCACCAG). Éstos se emplearon en la obtención de las sondas cuyas secuencias no se conocían. Posteriormente, y tras la secuenciación de todas las sondas se diseñaron cebadores específicos para cada sonda *inc/rep*, los cuales se describen en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.** Cebadores específicos diseñados en este trabajo, utilizados en la obtención de las sondas *inc/rep*.

Sonda	Cebador	Secuencia (5'→3')	(°C) <sup>a</sup>	Tamaño (pb)	Origen
repB/O	B/O dir B/O rv	ATACCAGCGTTTTCTGGC TTCTGACAGGCACATGAT	51	1.600	pMU700 <sup>b</sup>
rep9	com9 dir com9 rv	GAGCGCATCAATAGCCC AGGCTGGATATACTAAAGTA	49	539	pIP71 <sup>b</sup>
repFIA	FIA dir FIA rv	CTTTATCCATGCTGGTTCT CTTTCTTTTCTCAATGTATG	49	915	F <sup>b</sup>
repFIB	FIB dir FIB rv	TTTATATTCTGTTTCCTGCAG TGAGCAGACCACTCACTG	51	1.196	P307 <sup>b</sup>
repFIIA	FIIA dir FIIA rv	CAGCGCATCAATAGCCC AGACTGGATATACTAAAGTAAAGA	49	537	R1 <i>drd-19</i> <sup>b</sup>
repHI1	HI1 dir HI1 rv	AAAATGGTTTTCTTATTCCAACC AGCAGTTGATGTTTCAGTCTGC	57	2.211	TR6 <sup>b</sup>
repHI2	HI2 dir HI2 rv	AACGCTTTCTCCTGAGTC ATGATTTCAGATCGACGAG	55	1.955	TP116 <sup>b</sup>
repI1	I1 dir I1 rv	ATACCAGCGTTTTCTGGCCCGC GAGCTCGCCCCGGGGATC	65	1.157	R64 <i>drd-11</i> <sup>b</sup>
repL/M	L/M dir L/M rv	AACGCATAAAAATAGGGATG GGGCGATTCTTTAGGGGA	54	793	pMU407.1 <sup>b</sup>
repN	N dir N rv	GTCTAACGAGCTTACCGAAGC ACACCGCACCGTCACGGCA	68	1.043	pKM101 <sup>c</sup>
repP	P dir P rv	CCGGGCTGGTTGCCCTCG CGGGAGGGTTCGAGAAGGGG	48	617	RK2 <sup>b</sup>
repQ	Q dir Q rv	CGGGCATATTGGGCAAGGG CGCCACATGAGGCATGTTC	62	354	R1162 <sup>b</sup>
repU	U dir U rv	TTGGCCCCGTACGGAATCA ACGGTATTGACCAGGCGAA	62	955	RA3 <sup>b</sup>
repW	W dir W rv	AATCTGACGTTTTCCCTGCAA ATTCCAGAATAGAAAAGCGCG	60	1.156	RSa <sup>b</sup>
repX	X dir X rv	TAAAAGCCTTATATATTCTTT CCGTAAACAATTGCGTTGT	48	942	R6K <sup>b</sup>
repY	Y dir Y rv	GGGTAGTTATCACCCTTATA TCTCTATCAACTGGTGAGAAC	50	1.245	P1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Temperatura de hibridación; <sup>b</sup> Couturier *et al.*, (1988); <sup>c</sup> Este trabajo.

Para la identificación del grupo de incompatibilidad, empleando la técnica de PCR, se emplearon los cebadores (Tabla 2.4) y las condiciones de PCR descritas en Carattoli *et al.*, (2005b), a excepción de las siguientes modificaciones:

- Se realizaron reacciones independientes para cada par de cebadores empleados.
- Se partió de 5 ng de DNA plasmídico por cada 25 µl de volumen final de reacción.
- En el caso de las reacciones de amplificación con cebadores para los grupos II, B/O y K se utilizó una temperatura de hibridación de 67°C.

Los controles positivos de cada pareja de cebadores fueron proporcionados por A. Carattoli (Tabla 2.2). El termociclador utilizado fue Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems).

**Tabla 2.4.** Cebadores empleados en la determinación del grupo de incompatibilidad plasmídico.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)	No. acceso
catII dir	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	M20413
catII rv	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT		
catB/O dir	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	159	M28718
catB/O rv	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		
catK dir	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	160	M93063
catK rv	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA		
catFIC dir	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	AH003523
catFIC rv	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
catFrepB dir	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	AY234375
catFrepB rv	GAAGATCAGTCACACCATCC		
catA/C dir	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	X73674
catA/C rv	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		

En la Tabla 2.5 se detallan los cebadores empleados en la caracterización del grupo filogenético de las 106 cepas de *E. coli* de origen animal. Las condiciones de PCR empleadas se describen en Clermont *et al.*, (2000). Además, en esta misma tabla, se presentan los cebadores empleados en la determinación del estatus ExPEC de dichas cepas. Las secuencias de estos cebadores se obtuvieron de Johnson y Stell (2000).

Para la detección del estatus ExPEC se preparó una única mezcla de reacción de volumen final 25 µl que contenía de tampón de PCR 1x (Roche Diagnostics SL); MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 4 mM (Roche Diagnostics SL); 0,8 mM de cada uno de los 4

dNTP's (Roche Diagnostics SL); 0,6  $\mu$ M de cada cebador (a excepción de los cebadores señalados con un asterisco en la Tabla 2.5, los cuales se utilizaron a 0,3  $\mu$ M); 2  $\mu$ l de un lisado de colonia de cada cepa (véase apartado 2.6.1.1) y 2,5 U de polimerasa *Expand High Fidelity enzyme* (Roche Diagnostics SL).

La reacción de amplificación se realizó en el termociclador anteriormente comentado y el programa utilizado fue el siguiente:

Temperatura	Proceso	Tiempo (min)	no. ciclos
95°C	Desnaturalización	10	1
94°C	Desnaturalización	30	
66°C	Tª hibridación	30	25
68°C	Extensión	3	
72°C	Extensión final	10	1

**Tabla 2.5.** Cebadores utilizados en el estudio de la filogenia y del estatus ExPEC de las cepas de *E. coli* de origen animal.

Aplicación	Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Filogenia	<i>chuA</i> dir	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	<i>chuA</i> rv	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	<i>ypaA</i> dir	TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	211
	<i>ypaA</i> rv	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
	<i>tspE4C2</i> dir	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152
	<i>tspE4C2</i> rv	CGCGCCAACAAAGTATTACG	
Estatus ExPEC	<i>papAH</i> dir	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720
	<i>papAH</i> rv	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	
	* <i>papC</i> dir	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	200
	* <i>papC</i> rv	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	
	<i>sfa/focDE</i> dir	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410
	<i>sfa/focDE</i> rv	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
	* <i>afa/draBC</i> dir	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	559
	* <i>afa/draBC</i> rv	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	
	* <i>kpsMT II</i> dir	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272
	* <i>kpsMT II</i> rv	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
	<i>iutA</i> dir	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300
	<i>iutA</i> rv	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	

Para la identificación de otros factores de virulencia de las cepas caracterizadas como ExPEC, se preparó una mezcla para cada par de cebadores empleados (Tabla 2.6). Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las descritas en el caso de los

cebadores determinantes de ExPEC. La Tabla 2.6 resume los cebadores y las temperaturas de hibridación empleadas.

**Tabla 2.6.** Cebadores empleados en la identificación de factores de virulencia en las cepas de *E. coli* caracterizadas como ExPEC.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tamaño (bp)	(°C) <sup>a</sup>	Referencia
<i>fimC</i> dir	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG	497	65	Janßen <i>et al.</i> , 2001
<i>fimC</i> rv	CGTCATTTTGGGGTAAGTGC			
<i>csgA</i> dir	ACTCTGACTTGACTATTACC	200	56	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>csgA</i> rv	AGATGCAGTCTGGTCAAC			
<i>crl</i> dir	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	250	56	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>crl</i> rv	CTTCAGATTCAGCGTCGTC			
<i>tsh</i> dir	GGGAAATGACCTGAATGCTGG	420	66	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<i>tsh</i> rv	CCGCTCATCAGTCAGTACCAC			
<i>iucD</i> dir	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	62	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
<i>iucD</i> rv	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>iroC</i> dir	GGTATGCACCTGCTGCAGAT	1.592	55	Vandekerchove <i>et al.</i> , 2005
<i>iroC</i> rv	ATGCCAGCGGAGGACAATT			
<i>cvaC</i> dir	TATGAGAACTCTGACTCTAAAT	559	56	Vandekerchove <i>et al.</i> , 2005
<i>cvaC</i> rv	ATTTATAAACAAACATCACTAA			
<i>irp2</i> dir	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC	280	65	Schubert <i>et al.</i> , 1998
<i>irp2</i> rv	TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT			
<i>fyuA</i> dir	GCGACGGGAAGCGATTTA	780	62	Schubert <i>et al.</i> , 1998
<i>fyuA</i> rv	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA			
<i>iss</i> dir	GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC	760	56	Horne <i>et al.</i> , 2000
<i>iss</i> rv	CGCCTCGGGGTGGATAA			
<i>hlyA</i> dir	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1.177	63	Johnson y Stell, 2000
<i>hlyA</i> rv	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA			
<i>malX</i> dir	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA	930	62	Johnson y Stell, 2000
<i>malX</i> rv	TCGCCACCAATCACAGCCGAAC			
<i>hlyE</i> dir	TCGGCATCCACATTAGTTG	617	56	Ewers <i>et al.</i> , 2004
<i>hlyE</i> rv	AATCGAGTTGTTCCGTCTCT			

<sup>a</sup> Temperatura de hibridación.

### 2.6.3 Digestión de DNA

Las endonucleasas y tampones de restricción empleados se adquirieron generalmente a Roche Diagnostics SL y las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Antes de proceder a la digestión enzimática del DNA con la nucleasa *S1* de *Aspergillus oryzae* fue necesario eliminar los restos de detergente de la lisis celular, así como los restos de pronasa debido a su acción sobre las enzimas. Para ello, se procedió según el siguiente protocolo:

- Transferir un inserto a un tubo de microcentrífuga con 1 ml de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8) (véase anexo I) e incubar durante 18 h.
- Realizar varios lavados con TE, con una duración de 1 ó 2 h cada uno, y guardar a 4°C.
- Realizar 2 lavados de 15 min de una sección del inserto en 1 ml del tampón Tris-HCl 10 mM (AppliChem).
- Sustituir dicho tampón por 200 µl del tampón de incubación de la nucleasa *SI* (Acetato de sodio 33 mM; NaCl 50 mM; ZnSO<sub>4</sub> 0,033 mM; pH 4,5) (Véase anexo I) y 1 U de dicha enzima (Roche Diagnostics SL).
- Incubar durante 45 min a 37°C.
- Detener la reacción, sustituyendo dicho tampón por 100 µl del tampón de lisis II (EDTA 0,5 M pH 9-9,5; 1 % N-lauroil sarcosina) y mantener los tubos a 0°C durante 30 min.

#### 2.6.4 Defosforilación del extremo 5' de DNA

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- Realizar la siguiente mezcla de reacción en un tubo de microcentrífuga.

- vector a defosforilar	100 µl
- tampón 10x de la fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics SL)	20 µl
- H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	79 µl
- fosfatasa alcalina (1 U/µl) (Roche Diagnostics SL)	1 µl
- Mezclar bien todos los componentes e incubar a 37°C durante 30 min.
- Añadir 1 µl de enzima e incubar de nuevo a 37°C durante 30 min.
- Detener la reacción, incubando el tubo a 70°C durante 10 min.
- Añadir H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q hasta alcanzar un volumen de 400 µl.
- Hacer un tratamiento con fenol/cloroformo (1:1) (véase anexo I), agitar por inversión y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

- Recuperar la fase acuosa y añadir 400 µl de cloroformo/isoamílico (24:1) (véase anexo I), agitar por inversión y centrifugar en las condiciones descritas anteriormente.
- Recuperar la fase acuosa y añadir 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 4,8 (Merck) (véase anexo I).
- Dejar precipitar el DNA a -70°C durante toda la noche.
- Centrifugar a 13.000 durante 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento de DNA con 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar a 13.000 durante 5 min a 4°C.
- Secar el sedimento de DNA con una bomba de vacío (Speed Vac<sup>®</sup>, Savant).
- Resuspender el DNA en 20 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.
- Guardar a -20°C.

### **2.6.5 Ligación de DNA**

Este tipo de reacción se realizó utilizando la DNA ligasa del fago T4 (Roche Diagnostics SL), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las reacciones de ligación se llevaron a cabo teniendo en cuenta la concentración relativa de extremos del vector y del inserto. En el caso de la ligación de extremos cohesivos, la relación de extremos vector-inserto fue 1:2, mientras que para extremos romos fue 1:1. Para calcular las cantidades del vector y del inserto necesarias se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = [(\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}) / \text{kb vector}] \times \text{relación inserto/vector}$$

El protocolo realizado fue el siguiente:

- Preparar la siguiente mezcla de reacción de ligación, llevándola a un volumen final de 5 µl con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.
 

- tampón 2x de ligación (Promega)	2,5 µl
- vector e inserto	volúmenes necesarios
- DNA ligasa del fago T4 (Promega)	0,5 µl

- Incubar la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente en el caso de ligaciones con pGEM<sup>®</sup>-T y durante toda la noche, a 4°C, en el caso de ligaciones con pBSK (Stratagene).
- Inactivar la reacción, incubándola a 70°C durante 10 min.

## 2.6.6 Electroforesis horizontal de DNA en agarosa

Esta técnica se empleó frecuentemente para la visualización y análisis del DNA de diversos orígenes. Se basa en la migración que realiza el DNA cargado negativamente hacia un polo positivo al encontrarse dentro de un campo eléctrico a pH neutro. Los geles se realizaron a diferentes concentraciones de agarosa (Pronadisa) (del 0,4% a 3%) en función del tamaño de los fragmentos a analizar. La técnica se llevó a cabo en una cubeta horizontal (Mini-sub<sup>®</sup> cell GT, BioRad Laboratories) y los geles se fotografiaron con un digitalizador de imágenes (Mitsubishi).

### i) Preparación de los geles

- Pesar la cantidad de agarosa en polvo que se necesite y disolverla llevándola a ebullición.
- Dejar atemperar a 50°C y añadir bromuro de etidio (BrEt) (Amresco) a una concentración final de 0,5 µg/ml.
- Verter la agarosa disuelta sobre un soporte de cubeta y dejar solidificar, colocando los peines necesarios.
- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis con tampón TAE 1x (véase anexo I) y cargar las muestras diluidas en solución transportadora 6x (véase anexo I) a la relación 1:5 respecto al volumen final de la muestra.
- Aplicar un voltaje de 50 a 100 V el tiempo necesario en función del tamaño y las características de la muestra.
- Observar el gel en un transiluminador de luz UV (UVP) y fotografiar.

Como marcadores moleculares se emplearon el DNA del fago  $\lambda$  (Roche Diagnostics SL) digerido con *Hind*III (Roche Diagnostics SL) o con *Bst*EII (Roche Diagnostics SL), el

DNA del fago  $\Phi$ 174 digerido con *Hinf*I (Biotools) y la escalera de 50 pb DNA Ladder (New England Bio Labs).

La concentración de DNA se cuantificó con el espectrofotómetro *GeneQuant*, siguiendo las instrucciones del fabricante Amersham Biosciences.

### 2.6.7 Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles

El DNA se recuperó del gel de agarosa, irradiándolo con luz UV en un transiluminador (UVP) y cortando el fragmento de agarosa que contenía la banda de DNA con un bisturí. La fusión de la agarosa se realizó en un baño a 55°C, utilizando el kit comercial de recuperación de DNA en solución (GE Healthcare).

### 2.6.8 Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

- Preparar 100 ml de agarosa al 1% (Sea Kem ME agarose, FMC Bioproducts) en TBE 0,5x (Tris-Borato 50 mM; EDTA 0,1 mM; pH 7,5-8) (véase anexo I).
- Calentar al microondas hasta su completa homogeneización. Dejar enfriar.
- Limpiar el soporte, los moldes formadores del gel y el peine con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.
- Montar el sistema y verter los 100 ml de agarosa.
- Eliminar las burbujas y dejar solidificar.

Para la separación de los fragmentos obtenidos se utilizó el sistema *Contour-clamped homogeneous electric field* (CHEF; CHEF DRIII System apparatus, BioRad Laboratories). En este sistema, el campo eléctrico se genera por 24 electrodos puntuales equidistantes entre sí y dispuestos en un contorno hexagonal. Los electrodos que determinan el ángulo seleccionado, que puede variar entre 60° y 120°, presentan mayor potencial que el resto de los electrodos que funcionan con potenciales intermedios. Este hecho provoca un campo eléctrico homogéneo a lo largo de todo el gel (Chu *et al.*, 1986).

- Conectar la cubeta de electroforesis al sistema de refrigeración (Cooling module, BioRad Laboratories) a 14°C. Añadir 2 l de TBE 0,5x (Tris-borato 50 mM; EDTA

0,1 mM; pH 7,5-8) y conectar el sistema de recirculación del tampón (Variable Speed Pump, BioRad Laboratories).

- Cargar el DNA digerido. Para ello, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, colocar el fragmento digerido sobre la superficie interior de un *parafilm* y con ayuda de un cubreobjetos transferirlo al pocillo del gel, manipulándolo con cuidado. El inserto debe quedar pegado a la pared más externa del pocillo y lo más al fondo posible.
- Cargar los marcadores de pesos moleculares (Lambda Ladder PFG Marker y Low Range PFG Marker, New England Biolabs Inc.), colocándolos en los extremos y el centro del gel.
- Sellar los pocillos con agarosa (Sea Kem ME agarose, FMC Bioproducts), con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Deslizar la placa formadora del gel por encima del soporte y eliminar los restos de agarosa adherida a la base con un papel de celulosa. Disponer el gel en la cubeta de electroforesis y comprobar que queda cubierto por el tampón.
- Tapar la cubeta, comprobar que está equilibrada y conectarla a la fuente de alimentación (Power module, BioRad Laboratories).

Las condiciones empleadas fueron un ángulo de 120°, 14°C de temperatura y un voltaje de 6 V/cm. Las rampas de pulsos se distribuyeron en 2 bloques:

<b>Bloque</b>	<b>Pulso inicial (seg)</b>	<b>Pulso final (seg)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
1	5	25	6
2	30	45	11

- Tras la electroforesis, despegar ligeramente por los lados el soporte del gel de agarosa, levantarlo por un extremo y depositarlo en un recipiente con bromuro de etidio. Dejar teñir a 4°C durante aproximadamente 30 min. Se puede desteñir, si fuera necesario, sumergiendo el gel en un recipiente con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.

Realizar la foto del gel exponiéndolo a luz UV mediante un sistema de documentación de geles como GelDoc (BioRad Laboratories).

## 2.6.9 Métodos de hibridación

### 2.6.9.1 Marcaje colorimétrico de las sondas

Las sondas de DNA se marcaron con digoxigenina, utilizando el método de marcaje *random primed* (Feinberg y Vogelstein, 1983), que adiciona al extremo 3' un grupo DIG-11-dUTP cada 20-25 nucleótidos en la nueva hebra. Para ello, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Desnaturalizar el DNA durante 10 min a 100°C.
- Preparar la siguiente mezcla de marcaje:
  - 1 µg de DNA desnaturalizado.
  - 2 µl de la mezcla de *hexanucleotide mix 10x* (Roche Diagnostics SL).
  - 2 µl de la mezcla de marcaje *DIG DNA labeling mix 10x*: dATP, dCTP, dGTP, dTTP y DIG-dUTP (Roche Diagnostics SL).
  - H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q hasta un volumen final de 19 µl.
  - 1 µl de la enzima *Klenow* (Roche Diagnostics SL).
- Incubar a 37°C durante toda la noche (no más de 20 h).
- Detener la reacción mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,5 M a pH 8 (véase anexo I).
- Precipitar el DNA marcado con 1,25 µl de LiCl<sub>2</sub> 8 M (véase anexo I) y 70 µl de etanol absoluto frío (Carlo Erba Reagenti). Mezclar por inversión.
- Dejar 60 min a -70°C.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 100 µl de etanol al 70% (véase anexo I).
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C.
- Secar en una bomba de vacío (Speed Vac<sup>®</sup>, Savant) durante 4 min.
- Resuspender en 50 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q e incubar durante 30 min a 37°C.

Para determinar la concentración de las sondas marcadas con digoxigenina se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Realizar las diluciones -1, -2, -3, -4 de la sonda marcada en un volumen final de 10  $\mu$ l.
- Utilizar como patrón de referencia de DNA marcado el *DIG-labeled Control DNA* (Roche Diagnostics SL) y realizar las mismas diluciones que en el caso de la sonda marcada.
- Poner 1  $\mu$ l de cada una de las diluciones en un filtro de nailon 100% *Biodyne<sup>B</sup>* (Pall Gelman laboratory) de manera seriada y en orden.
- Fijar el DNA al filtro en un horno de radiación UV (Stratalinker 2400, Stratagene).
- Poner el filtro en una placa de Petri de plástico con 10 ml de solución de bloqueo (véase anexo I) con 2  $\mu$ l de anticuerpo antidigoxigenina (Roche Diagnostics SL) y agitar suavemente durante 30 min.
- Pasar el filtro a una nueva placa de Petri, añadir 10 ml de tampón PBS 1x (véase anexo I) y agitar durante 5 min.
- Repetir el paso anterior.
- Eliminar el tampón PBS 1x y dejar en agitación media durante 1 min en tampón 3 (véase anexo I).
- Eliminar el tampón 3 y añadir 10 ml de la solución colorimétrica (véase anexo I).
- Mantenerlo en oscuridad y sin agitación para permitir la aparición de color.
- Detener la reacción con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.

#### 2.6.9.2 Hibridación por *dot blot*

Se empleó el sistema *PR648 Slot Blot Filtration Manifolds* (Amersham Pharmacia Biotech) conectado a un sistema de succión (Millipore). El procedimiento se llevó a cabo empleando 2,5  $\mu$ g de DNA de los plásmidos problema y 1  $\mu$ g de los controles positivos y negativos.

- Depositar en un tubo de microcentrífuga 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q estéril y la cantidad de DNA necesaria de los plásmidos problema y de los controles, previamente cuantificados.
- Incubar en un baño a 100°C durante 10 min.
- Mantener los tubos 5 min a 0°C para evitar la renaturalización del DNA.

- Montar el sistema *Slot Blot*, colocando en medio una membrana de nailon 100% *Biodyne<sup>B</sup>* (Pall Gelman laboratory), previamente humedecida con el tampón PBS 1x (véase anexo I).
- Dispensar el DNA sobre la membrana a través de los pocillos con cuidado de no generar burbujas.
- Conectar la bomba de succión y estabilizarla a una presión de 13 a 25 cm de Hg.
- Esperar a que se absorba el volumen total dispensado.
- Lavar la membrana, dispensando 3 ml del tampón PBS 1x en cada pocillo e incrementar la presión hasta un máximo de 50 cm de Hg.
- Repetir el paso anterior dos veces más.
- Desmontar el sistema *Slot Blot* y después apagar la bomba de succión.
- Depositar la membrana sobre un papel absorbente GB002 (Scheicher & Schuell bioScience, Inc) y dejar secar durante 2 min.
- Fijar dos veces el DNA a la membrana en un horno de radiación UV (Stratalinker 2400, Stratagene).
- Proceder a la prehibridación y posterior hibridación de la membrana de la misma forma que se describe en el siguiente apartado.

### 2.6.9.3 Hibridación por *Southern blot*

Este método se realizó a partir de los geles obtenidos mediante PFGE, previa digestión del DNA plasmídico con la nucleasa *S1*, siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

#### **Transferencia**

- Lavar el gel con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q durante 10 min para eliminar los restos de bromuro de etidio.
- Hacer un tratamiento despurinizador con HCl 0,25 M (Panreac) (véase anexo I), agitando suavemente durante 30 min.
- Lavar durante 5 min con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.
- Realizar un tratamiento desnaturizador con NaOH 0,4 M (Panreac) (véase anexo I), agitando suavemente durante 20 min.
- Lavar durante 5 min con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.

- Poner una membrana de nailon 100% *Biodyne*<sup>B</sup> (Pall Gelman laboratory) sobre un papel absorbente GB002 (Scheicher & Schuell bioScience, Inc) y humedecerlos con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.
- Colocarlos en un aparato de transferencia (VacuGene XL, Pharmacia Biotech) y depositar encima el gel de agarosa.
- Conectar una bomba de succión a 60 mbar (VacuGene Pumb, Pharmacia Biotech). y cubrir la totalidad del gel con tampón SSPE 10x (véase anexo I).
- Realizar la transferencia durante 2 h.
- Pasado ese tiempo lavar la membrana con SSC 2x (véase anexo I) para eliminar los restos de agarosa.
- Fijar por dos veces el DNA a la membrana en un horno de radiación UV (Stratalinker 2400, Stratagene).

Tras la transferencia, es aconsejable teñir de nuevo el gel con bromuro de etidio para comprobar que la transferencia ha sido correcta.

### **Prehibridación**

- Colocar la membrana en un tubo “*roller*” de hibridación con 70 ml de solución de prehibridación (véase anexo I), previamente atemperada a 42°C, y colocarlo en un horno de hibridación (Hybaid).
- Incubar a una baja velocidad durante 4 horas a una temperatura de alta astringencia (42°C).

### **Hibridación**

La concentración de sonda marcada que se utilizó fue de 35 ng por cada ml de solución de prehibridación.

- Pasadas las 4 horas del proceso de prehibridación, añadir la cantidad de sonda a utilizar en un volumen de solución de prehibridación proporcional al tamaño de la membrana. Desnaturalizar el DNA de la mezcla durante 10 min a 100°C en un baño.
- Mantener 3 min a 0°C.

- Introducir la membrana en una bolsa de hibridación (Roche Diagnostics SL) y, posteriormente, añadir la solución de prehibridación con la sonda desnaturalizada.
- Sellar la bolsa e incubar en posición horizontal en el mismo horno de hibridación durante 16 h a temperatura de alta astringencia (42°C).

### **Lavados**

- Colocar la membrana en una cubeta de vidrio y realizar 2 lavados en agitación, de 5 min cada uno a temperatura ambiente con la solución I (SSC 2x al 0,1% de SDS) (véase anexo I) para eliminar los restos de sonda no hibridada.
- Colocar la membrana en un tubo “*roller*” de hibridación y realizar 2 lavados de 15 min, en un horno de hibridación (Hybaid) con la solución II (SSC 0,1x al 0,1% de SDS) (véase anexo I) a una temperatura de 70°C.
- Colocar la membrana en una cubeta de vidrio y agitarla suavemente durante 1 min con tampón PBS 1x (véase anexo I) para equilibrar el pH a 7,5.
- Pasar la membrana a una cubeta de vidrio y añadir un volumen de la solución de bloqueo (véase anexo I) que cubra toda la membrana. Agitar suavemente durante 30 min.

### **Inmunodetección**

- Transferir la membrana a una placa de Petri de 15 cm de diámetro con 50 ml de solución de bloqueo con anticuerpo antidigoxigenina (1:5000) (Roche Diagnostics SL) y agitar suavemente durante 30 min.
- Eliminar los restos del anticuerpo no adherido mediante 2 lavados enérgicos en agitación de 15 min con tampón PBS 1x.
- Transferir la membrana a una bandeja nueva y sumergirla en 100 ml de tampón 3 (véase anexo I). Agitar suavemente durante 3 min, equilibrando el pH a 9,5 para la posterior activación de la fosfatasa alcalina.

## Revelado

- Preparar la solución colorimétrica (véase anexo I), verterla en una bandeja de vidrio y depositar la membrana.
- Mantener la bandeja en oscuridad sin agitación para permitir la aparición de color.
- Detener la reacción con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.

### 2.6.9.4 Deshibridación de las membranas

Se ha seguido el protocolo recomendado por Boehringer Mannheim.

- Calentar la *N-N*, dimetilformamida a 60°C en un baño.
- En ese mismo baño, incubar la membrana con la *N-N*, dimetilformamida atemperada en una bandeja especial para ello. Cambiar varias veces la *N-N*, dimetilformamida hasta que el color azul característico haya desaparecido por completo del filtro (duración de entre 1 y 2 h). Utilizar mascarilla de alta protección frente a los vapores tóxicos.
- Con ayuda de un agitador, lavar la membrana enérgicamente con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q durante 5 min.
- Repetir el paso anterior.
- Lavar la membrana con una solución de deshibridación (NaOH 0,2 M; SDS 0,1%) (véase anexo I) a 37°C en agitación durante 20 min para eliminar la sonda unida al DNA.
- Repetir el paso anterior.
- Lavar la membrana con SSC 2x (véase anexo I) en una bandeja con agitación durante 10 min a temperatura ambiente.
- Tras este proceso, la membrana está lista para ser prehibridada e hibridada de nuevo con una segunda sonda.

### 2.6.10 Secuenciación

La secuenciación se realizó siguiendo el método descrito por Sanger *et al.*, (1977), utilizando el secuenciador *ALFexpress<sup>TM</sup> DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech).

En el caso de las sondas clonadas en los vectores pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) y pBSK (Stratagene) se utilizó el *kit* comercial *fmol<sup>®</sup>DNA Sequencing System* (Promega), con oligonucleótidos marcados con Cy5. En los casos en los que el elevado tamaño de la sonda no permitió obtener la secuencia completa se recurrió al diseño de cebadores específicos internos de la secuencia y al empleo del *kit Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing System* (Amersham Biosciencias) que utiliza dideoxinucleótidos (ddNTP) marcados con Cy5. En ambos casos, las muestras fueron procesadas siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 2.7 Métodos informáticos

El diseño de los cebadores específicos se realizó mediante la comparación de las secuencias, utilizando el programa informático *DNASTAR* (DNASTAR, Inc). El análisis comparativo de las secuencias se realizó con el programa *BLAST 2.0 QBLAST* del *National Center for Biotechnology Information site* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

Para el análisis de los perfiles plasmídicos de las cepas transconjugantes se empleó el programa informático *Fingerprinting II* (BioRad Laboratories).

## 2.8 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos de las cepas de las granjas de animales se realizaron con los software: SPSS v14.0 para Windows y SPAD v5.0.

Las comparaciones de las proporciones  $2 \times 2$  se realizaron con el test estadístico de Khi-cuadrado (F de Fisher). El test Mann-Whitney se utilizó para comparar los factores de virulencia de las cepas y las resistencias a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos. Se consideraron todos aquellos análisis en los que se obtuvo un nivel de significación del 0,05. Estos análisis fueron realizados por el Servei d'Estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### ***3. RESULTADOS y DISCUSIÓN***

---

### 3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento y caracterización de enterobacterias de granjas de aves, de cerdos y de conejos

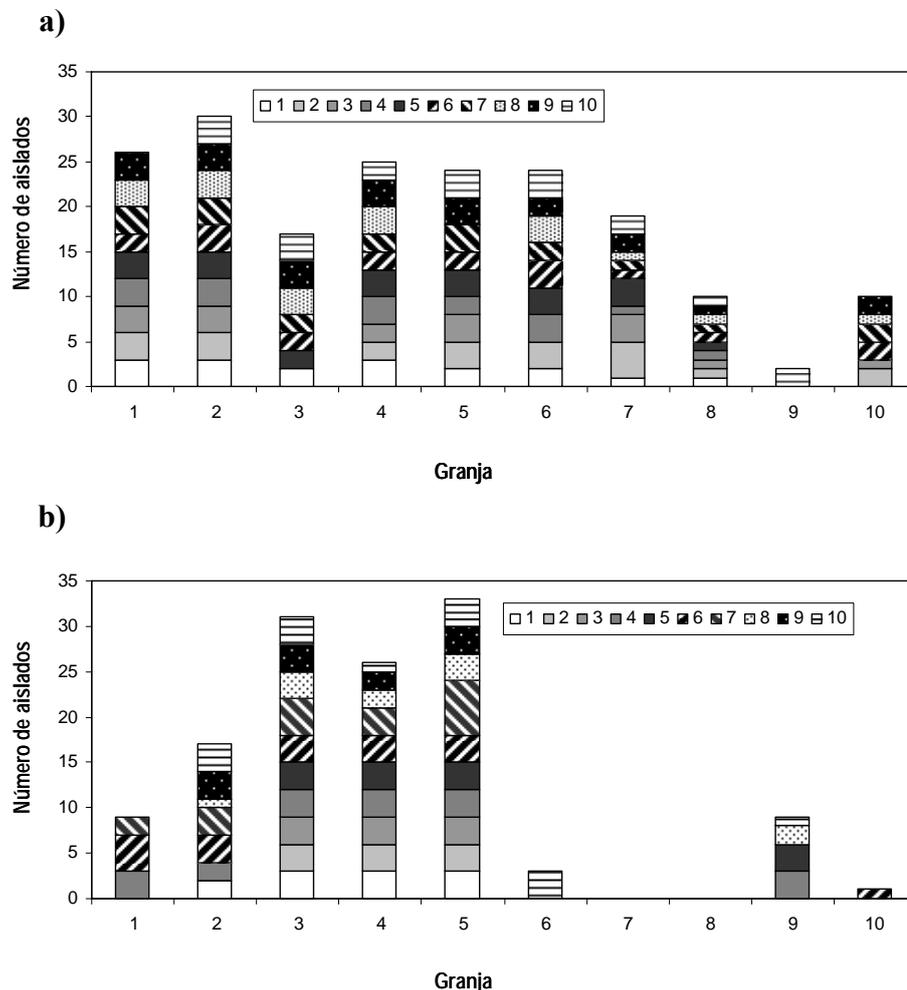
Recientemente, diversos autores han reportado el aislamiento de cepas portadoras de BLEE y cefamicinasas en animales de granja en algunos países (Winokur *et al.*, 2001; Briñas *et al.*, 2003; Aarestrup *et al.*, 2004; Liebana *et al.*, 2004; Shiraki *et al.*, 2004; Weill *et al.*, 2004; Briñas *et al.*, 2005; Hasman *et al.*, 2005). Por ello, el primer objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de este tipo de resistencias y de carbapenemasas en granjas de engorde de aves, de cerdos y de conejos del área geográfica de Catalunya. Para ello, se seleccionaron diez granjas de cada tipo y se tomaron muestras de diez puntos de cada una de ellas. Como se indica en la Tabla 3.1, la siembra en placas de agar MacConkey suplementadas con cefotaxima (2 mg/l) dió lugar al aislamiento de 360 clones, de los cuales 337 mostraron un patrón de resistencias compatible con el descrito para BLEE y  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C. El mayor número de aislados correspondió a las granjas de aves, seguido de las de cerdos, siendo muy inferior el número de clones procedentes de las granjas de conejos. En contraste con estos resultados, no se observó crecimiento en las placas selectivas para bacterias portadoras de carbapenemasas.

**Tabla 3.1.** Clones aislados en los tres tipos de granjas estudiadas.

Granja	No. clones	No. clones con patrón de resistencia compatible
Aves	192	187
Cerdos	131	129
Conejos	37	21
Total	360	337

En la Figura 3.1a se presenta el número de aislados en cada uno de los diez puntos de muestreo de las diez granjas de aves y en la Figura 3.1b se presentan los datos correspondientes a las granjas de cerdos. Como puede observarse en dichas figuras, se obtuvieron clones susceptibles de portar BLEE y  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C en

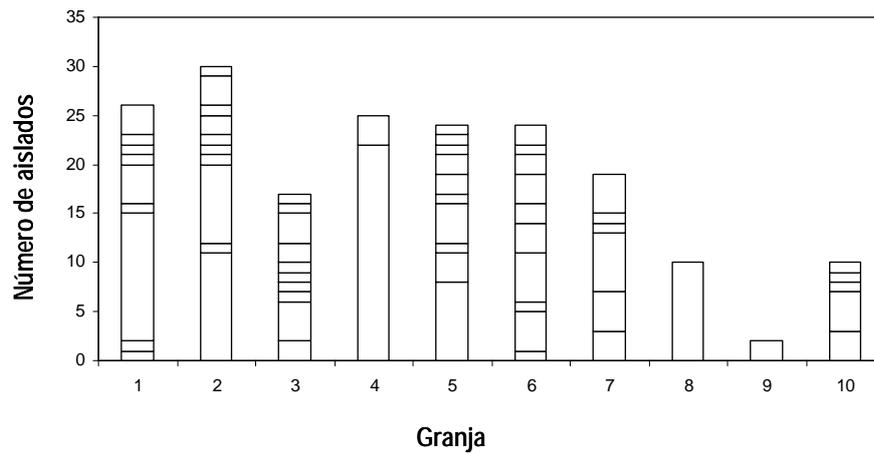
todas las granjas de aves y en ocho de las de cerdos. Por lo que se refiere a las granjas de conejos, solamente se obtuvieron clones en dos de las diez granjas muestreadas.



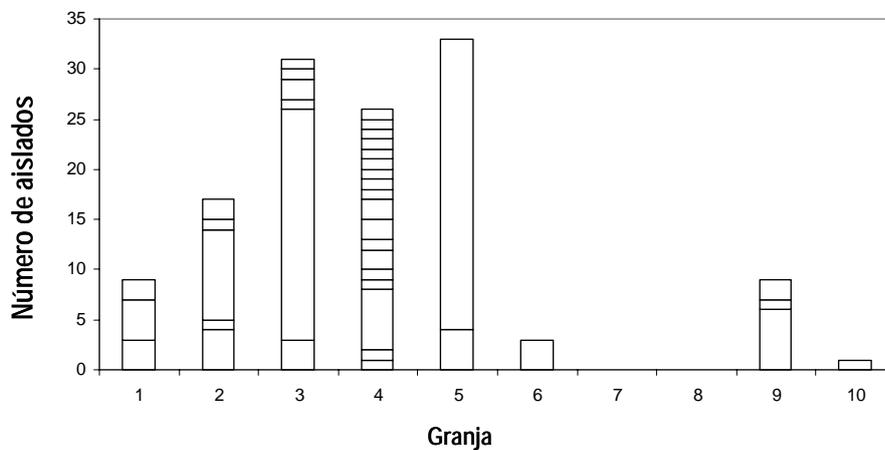
**Figura 3.1.** Número de clones aislados en cada punto de muestreo en las granjas de aves (a) y de cerdos (b).

Seguidamente, y con el fin de realizar una primera selección de cepas, se determinaron los perfiles ERIC de los 337 aislados, obteniéndose 107 cepas con diferente perfil. Todas ellas fueron *E. coli*, a excepción de una cepa de *Enterobacter cloacae* aislada de una granja de conejos. En la Figura 3.2 se presenta el número de aislados para cada perfil ERIC identificado en las granjas de aves (a) y de cerdos (b).

a)



b)



**Figura 3.2.** Número de clones que comparten perfiles ERIC aislados de granjas de aves (a) y de cerdos (b).

Es de destacar que en todas las granjas de cerdos, a excepción de la 4, la variedad de perfiles ERIC fue baja, lo cual indica una elevada clonalidad de los aislados. En cambio, en las granjas de aves, a excepción de las granjas 4, 8 y 9, el número de perfiles ERIC diferentes es superior a 6, lo que sugiere que en este tipo de granjas el número de clones diferentes es más elevado que en las de cerdos. En el caso de las dos granjas de conejos, de los 21 clones aislados (Tabla 3.1) se obtuvieron 4 perfiles ERIC diferentes.

Como técnica epidemiológica concluyente se realizó una macrorestricción del DNA genómico mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE), utilizando el enzima de restricción *Xba*I. De las 107 cepas seleccionadas por ERIC se obtuvieron 62, 37 y 4

perfiles diferentes de las cepas de granjas de aves, cerdos y conejos, respectivamente. Para realizar este estudio, se siguieron los criterios de Tenover *et al.*, (1995), considerándose no relacionadas aquellas cepas que presentaron tres o más bandas de diferencia.

Cuando se estudió el tipo de  $\beta$ -lactamasa que portaban las 107 cepas, se observó que la mayoría eran BLEE (Tabla 3.2), mientras que sólo 14 de ellas, procedentes de granjas de aves y de conejos, codificaban enzimas del tipo CMY.

**Tabla 3.2.** Cepas portadoras de BLEE o cefamicinasas aisladas de granjas de animales.

Granja	Número de cepas		
	BLEE	CMY	Total
Aves	51	13	64
Cerdos	39	0	39
Conejos	3	1	4
	95	14	<b>107</b>

La caracterización del patrón de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la técnica de isoelectroenfoco y la secuenciación permitieron identificar las enzimas, las cuales se muestran en la Tabla 3.3. Como puede observarse en dicha tabla, todas las cepas fueron portadoras de una sola enzima a excepción de 3 de ellas, procedentes de granjas de aves, que codificaron 2 enzimas BLEE.

Cabe resaltar que la mayor diversidad enzimática se encontró en las granjas avícolas, destacando en ellas las enzimas pertenecientes al grupo CTX-M-9, particularmente la CTX-M-14, presente en 30 de las 64 cepas aisladas. La  $\beta$ -lactamasa plasmídica de clase C, CMY-2, fue la segunda enzima más prevalente en estas granjas, estando codificada en 13 cepas procedentes de 6 de las 10 granjas muestreadas. Dos cepas procedentes de la granja 6 presentaron la enzima TEM-52, la cual ya había sido descrita en una cepa de *E. coli* aislada de un pulmón de conejo (Briñas *et al.*, 2005), pero nunca había sido encontrada en cepas de origen aviar.

**Tabla 3.3.** BLEE y  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C identificadas en las cepas aisladas de granjas de animales.

Granja	Enzima	Número de cepas										Total	Porcentaje <sup>a</sup>
		Número de granjas					Número de granjas						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	Porcentaje <sup>a</sup>
<b>Aves</b>													
	BLEE											64	79,7
	TEM-52				2							51	3,1
	SHV-12	1	2		1				1			5	7,8
	CTX-M-1				1							1	1,6
	CTX-M-9	1	1	1	1	3		1	1			9	14,1
	CTX-M-14	4	7	5	1	4	1	4	1	2		29	45,3
	CTX-M-32			1				1				2	3,1
	CTX-M-14 + CTX-M-1							1				1	1,6
	SHV-5 + CTX-M-9		1									1	1,6
	SHV-2 + CTX-M-1					1						1	1,6
	$\beta$ -lactamasa plasmídica clase C											13	20,3
	CMY-2	3	1	2		5		1		1		13	20,3
<b>Cerdos</b>													
	BLEE											39	100
	SHV-5	1	3									4	10,3
	SHV-12			1		2	1		3	1		8	20,5
	CTX-M-1	2	2	5	18							27	69,2
<b>Conejos</b>													
	BLEE											4	75
	CTX-M-9		1									3	25
	CTX-M-14	2										2	50
	$\beta$ -lactamasa plasmídica clase C											1	25
	CMY-2			1								1	25

<sup>a</sup> Porcentaje referido al total de las cepas aisladas de cada tipo de granja.

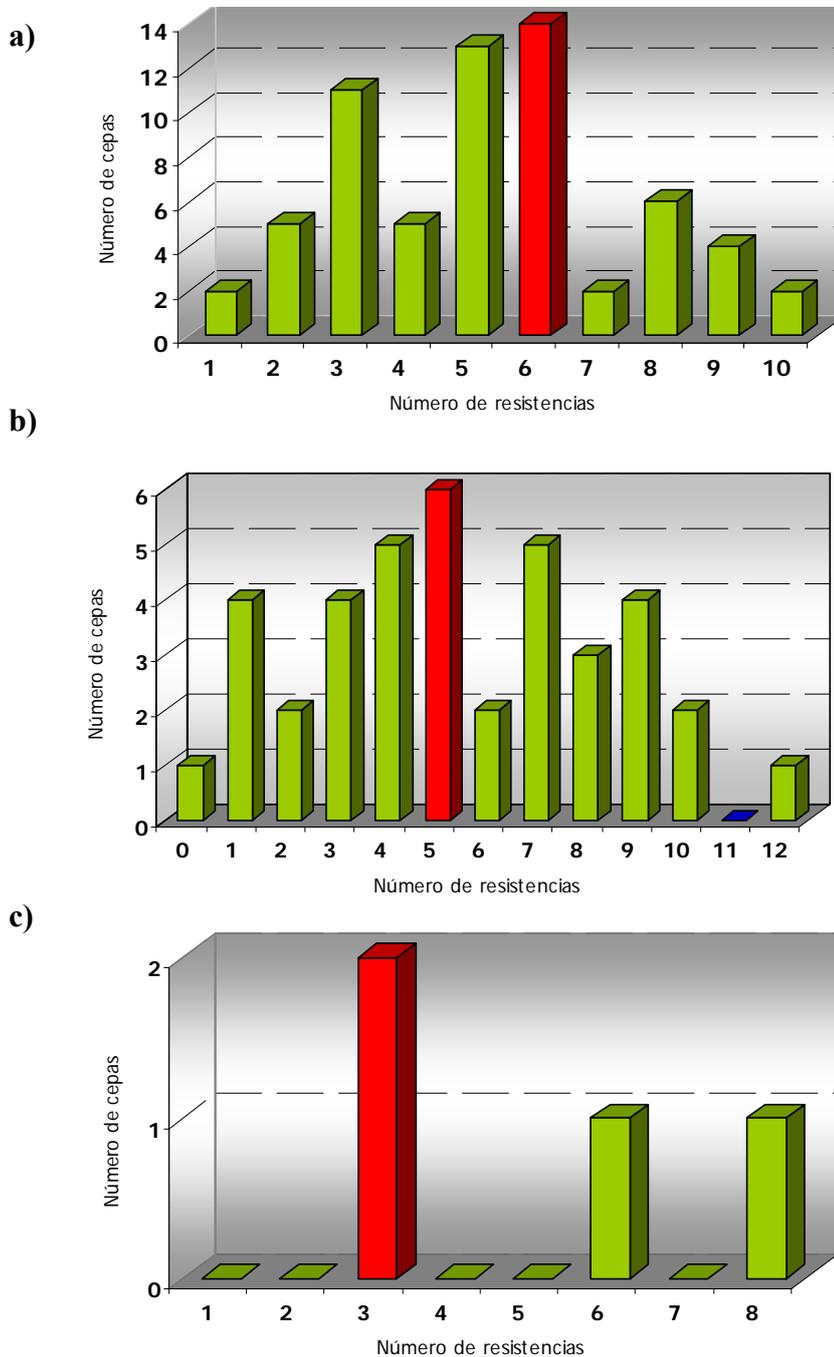
Los resultados obtenidos en las granjas de cerdos difieren de lo mencionado anteriormente. Así, no se detectó ninguna CMY-2 ni tampoco enzimas del grupo CTX-M-9. En este tipo de granjas, la enzima CTX-M-1, descrita por primera vez en este ambiente, fue la mayoritaria. Las enzimas de la familia SHV se identificaron tanto en granjas de aves como de cerdos, destacando la presencia de la enzima SHV-2 en las primeras y de la SHV-5 en las segundas, siendo éstos hallazgos la primera vez que se reportan en este tipo de animales.

Los tipos de  $\beta$ -lactamasas encontrados en granjas de aves son muy parecidos a los hallados en humanos, tanto en muestras clínicas como en portadores fecales (Bou *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2002a; Mesa, 2007). Esta coincidencia sugiere que las aves podrían ser un reservorio de estas resistencias, las cuales podrían transmitirse a humanos. Por el contrario, esta transmisión no sería tan esperable desde cerdos, ya que las enzimas detectadas en este tipo de granjas son diferentes de las reportadas en humanos.

Como ya se ha indicado anteriormente, únicamente se aislaron 4 cepas diferentes de granjas de conejos, de las cuales 3 de ellas portaron enzimas del grupo CTX-M-9 y una cuarta cepa codificó la enzima CMY-2, la cual no había sido descrita hasta el momento en este ambiente. El bajo número de cepas aisladas de granjas de conejos, en comparación con los aislamientos hechos en granjas de aves y de cerdos, podría explicarse por la diferente práctica en el uso de antimicrobianos según el tipo de animal de producción. Así, los conejos no son tratados normalmente con  $\beta$ -lactámicos, ya que éstos les generan cambios en su flora intestinal, lo cual acaba provocándoles una enterotoxemia (Hara-Kudo *et al.*, 1996), mientras que  $\beta$ -lactámicos como la amoxicilina y el ácido clavulánico se administran con frecuencia a otro tipo de animales de producción. Por ello, es posible hipotetizar que la baja prevalencia de estas resistencias en granjas de conejos se deba precisamente a la escasa administración de  $\beta$ -lactámicos.

La caracterización de las resistencias a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos mostró que del total de cepas aisladas, un 93% presentaron resistencia a dos o más compuestos antimicrobianos, 6 cepas (5,6%), tanto de origen porcino como avícola, presentaron resistencia a un compuesto y tan sólo una cepa aislada de una granja de cerdos y portadora de la enzima CTX-M-1 fue sensible a todos los antimicrobianos estudiados.

Al analizar el número de marcadores de resistencia de las cepas, se observó una alta variabilidad. No obstante, predominaron las cepas aisladas de granjas de aves con 3, 5 y 6 marcadores de resistencia y con 4, 5 y 7 en las cepas de granjas de cerdos. De las 4 cepas aisladas de granjas de conejos, 2 presentaron tres resistencias (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Número de resistencias a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos de las cepas aisladas de granjas de aves (a), cerdos (b) y conejos (c). Se destaca en rojo el número de cepas con el mayor número de resistencias.

Del total de cepas procedentes de granjas de aves y de cerdos, un 83% fueron resistentes a tetraciclina (TET) y un 65% a sulfonamidas (SUL) (Tabla 3.4). Diferencias más acusadas se apreciaron al comparar el número de cepas resistentes al ácido nalidixico (NAL). Así, un 90% de las cepas avícolas fueron resistentes a esta quinolona, comparado con el 53,5% de las cepas porcinas. Pese al bajo número de cepas aisladas de las granjas de conejos, 3 de las 4 cepas presentaron el patrón NAL<sup>R</sup>, SUL<sup>R</sup> y TET<sup>R</sup>.

**Tabla 3.4.** Resistencia a antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos de las cepas aisladas de granjas de animales.

Antimicrobiano <sup>a</sup>	No. de cepas resistentes (%) <sup>b</sup>					
	Aves		Cerdos		Conejos	
CM	20	(31,2)	14	(35,9)	1	(25)
NT	11	(17,2)	16	(41)	1	(25)
TET	52	(81,2)	33	(84,6)	3	(75)
CIP	20	(31,2)	13	(33,3)	1	(25)
NAL	57	(89,1)	21	(53,8)	3	(75)
GEN	5	(7,8)	4	(10,3)	1	(25)
KAN	11	(17,2)	8	(20,5)	2	(50)
STR	44	(68,7)	22	(56,4)	1	(25)
TOB	5	(7,8)	6	(15,4)	2	(50)
SUL	43	(67,2)	25	(64,1)	3	(75)
TMP	31	(48,4)	26	(66,7)	1	(25)
SXT	28	(43,7)	21	(53,8)	1	(25)

<sup>a</sup> Cloranfenicol (CM), nitrofurantoina (NT), tetraciclina (TET), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidixico (NAL), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), estreptomicina (STR), tobramicina (TOB), sulfonamida (SUL), trimetoprim (TMP), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). <sup>b</sup> Porcentaje referido al total de cepas aisladas de cada tipo de granja.

A pesar de las diferencias existentes entre los diferentes países en el uso de los antimicrobianos, las tetraciclinas son los agentes más utilizados para el tratamiento de las infecciones en animales (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). En segundo término, la amoxicilina, combinada con el ácido clavulánico, es una de las penicilinas más empleadas en veterinaria. Por el contrario, las cefalosporinas de espectro extendido y las cefamicinas son muy inusuales, al igual que el cloranfenicol. Respecto a éste último, sorprende el porcentaje de cepas resistentes aisladas, sobre todo si se tiene en cuenta que su uso en veterinaria está prohibido debido a los residuos que se acumulan en los tejidos del animal (Guardabassi y Courvalin, 2006). Cabe destacar el hecho de que a pesar de no existir presión selectiva, estas resistencias se mantienen en una parte de la población bacteriana.

Teniendo presente estas prácticas, una posible razón que explique la presencia de  $\beta$ -lactamasas en cepas de granjas de animales sería la posible coselección de las mismas por la administración de otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, cuyos genes de resistencia pueden localizarse en los mismos elementos móviles que las  $\beta$ -lactamasas. De hecho, transposones e integrones han sido relacionados con los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (Bonnet, 2004; García *et al.*, 2005). En este estudio, muchas de las cepas productoras de enzimas CTX-M-9 son resistentes a estreptomicina, sulfonamidas y trimetoprim, lo cual podría estar relacionado con la selección de un inusual integrón de clase I que codifica los genes *sull*, *dfrA16* y *aadA2*, responsables de estas resistencias (Sabaté *et al.*, 2002b). De igual forma, la presencia de cepas con la enzima CMY-2 aisladas de granjas de aves, podría explicarse igualmente por el fenómeno de la coselección, ya que dichas cepas eran también resistentes a cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina y tetraciclina. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la selección de las enzimas CTX-M-1 y CTX-M-14 en la mayoría de aislados de granjas de aves y de cerdos, ya que estas cepas no presentaron un patrón de resistencias similar a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos.

El conjunto de los resultados obtenidos pone de manifiesto que las granjas de animales son un reservorio de genes de BLEE y CMY-2 y también sugieren que el tratamiento de los animales con antibióticos  $\beta$ -lactámicos puede ser una de las causas de la prevalencia de este tipo de resistencias, las cuales pueden además coseleccionarse por el uso de antibióticos no  $\beta$ -lactámicos.

### 3.2 Estudios de filogenia y virulencia

Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, diversos trabajos realizados con cepas de *E. coli* comensales, patógenos intestinales y ExPEC indican que hay claras diferencias respecto al grupo filogenético del que derivan y también en relación al número de determinantes de virulencia que portan. Así, las cepas de *E. coli* comensales proceden de los grupos filogenéticos A y B1 y contienen un bajo número de factores de virulencia (Johnson y Stell, 2000). En este contexto, el siguiente objetivo de este trabajo fue averiguar el grupo filogenético de las 106 cepas de *E. coli* que codifican BLEE y  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C, aisladas de granjas de animales.

La hipótesis inicial presumía que dichas cepas deberían ser, en su gran mayoría, comensales, ya que en las granjas objeto de estudio no se habían reportado casos de animales que presentaran infecciones compatibles con *E. coli*. Los resultados obtenidos (Tabla 3.5) corroboraron en parte dicha hipótesis ya que la mayoría de las cepas derivaron de los grupos filogenéticos A (36,8%) y B1 (31,1%) y, únicamente, el 5,7% pertenecieron al filogrupo B2, el cual incluye a las cepas de *E. coli* que son altamente patógenas (Picard *et al.*, 1999). No obstante, cabe destacar el alto porcentaje de cepas (26,4%) pertenecientes al filogrupo D, lo cual conduce a pensar en la posible presencia de cepas patógenas intestinales o extraintestinales en estas granjas. Estos resultados, a pesar de proceder de cepas con diferente origen, concuerdan con un estudio anterior, realizado en cepas clínicas de *E. coli*, en donde la producción de BLEE se produjo principalmente en cepas de los filogrupos A y D (Branger *et al.*, 2005).

Al analizar los resultados desde el punto de vista del origen de las cepas (Tabla 3.5), se apreció que aquellas que fueron aisladas de granjas de cerdos presentaron una distribución filogenética típicamente comensal, mostrando una asociación positiva con el grupo A ( $p = 0,018$ ) y negativa con el grupo D ( $p = 0,049$ ). En cambio, en las granjas de aves, el número de cepas pertenecientes al filogrupo A (26,6%) fue significativamente inferior ( $p = 0,007$ ) observándose, en cambio, una alta presencia de cepas de los filogrupos B2 y D. El papel de las aves de corral como reservorio de cepas patógenas de humanos ha sido apuntado con anterioridad (Johnson *et al.*, 2003a). De acuerdo con ello, en este estudio, un 40% de las cepas avícolas derivó de los grupos filogenéticos B2 y, principalmente, D.

**Tabla 3.5.** Distribución filogenética de las cepas de *E. coli* aisladas de granjas de animales.

Granja	Grupo filogenético (%) <sup>a</sup>				Total cepas
	A (n = 39)	B1 (n = 33)	B2 (n = 6)	D (n = 28)	
Aves	17 (26,6) (*)	21 (32,8)	5 (7,8)	21 (32,8)	64
Cerdos	20 (51,3) *	12 (30,8)	1 (2,6)	6 (15,4) (*)	39
Conejos	2 (66,7)	0	0	1 (33,3)	3

<sup>a</sup> valor  $p$  fruto de la comparación de los grupos indicados con el resto de grupos. \*  $p < 0,05$ . (\*) El asterisco entre parentesis indica las asociaciones negativas.

Asimismo, se analizó si había alguna relación estadísticamente significativa entre la filogenia de las cepas y diversas características previamente estudiadas. Los resultados

obtenidos mostraron que las cepas del grupo filogenético B2 codificaban en su gran mayoría enzimas del grupo CTX-M-9. Concretamente, 5 cepas B2 (83,3%) portaron la enzima CTX-M-14 ( $p = 0,031$ ) (Tabla 3.6). Este hecho podría explicarse por la mayor presencia de estas enzimas, especialmente la CTX-M-14, en las granjas de aves (Blanc *et al.*, 2006). De forma similar, las enzimas del grupo CTX-M-1 se asociaron significativamente con el filogrupo A ( $p = 0,013$ ). Esta asociación es especialmente importante en las granjas de cerdos, donde la enzima CTX-M-1 fue la más prevalente (Blanc *et al.*, 2006). Respecto a la resistencia a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, tan sólo se observaron diferencias significativas en el caso de las cepas del grupo filogenético A ( $p = 0,001$ ), las cuales presentaron menor número de resistencias que las cepas del filogrupo D ( $p = 0,006$ ) (Tabla 3.6). Estas últimas fueron todas ellas resistentes al ácido nalidíxico y la resistencia a la ciprofloxacina fue mayoritaria, mientras que las cepas sensibles a estos dos antimicrobianos prevalecieron en el filogrupo A ( $p = 0,001$ ). Branger y colaboradores, en un trabajo realizado en cepas clínicas y de la comunidad, describió que las pertenecientes al filogrupo D<sub>1</sub> presentaban con mayor frecuencia resistencia a las fluoroquinolonas y enzimas de la familia CTX-M (Branger *et al.*, 2005), mientras que en el presente estudio, la proporción de cepas pertenecientes al filogrupo D y portadoras de las enzimas CTX-M estudiadas fue la más baja.

En la Tabla 3.6 se muestra también la distribución de los marcadores de virulencia *papAH/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *KpsM II*, empleados para identificar las cepas ExPEC. Estos marcadores se localizaron principalmente en las cepas del grupo D ( $p = 0,005$ ) y, en particular, en las cepas aisladas de granjas de aves ( $n = 33$ ). Paralelamente, su presencia fue significativamente inferior en las cepas del filogrupo B1 ( $p = 0,013$ ), especialmente los determinantes *papC* y *kpsM II* ( $p = 0,029$  y  $p = 0,008$ , respectivamente). El alelo *papC* se asoció al grupo filogenético B2 ( $p = 0,011$ ) y *iutA* y *kpsM II* al grupo D ( $p = 0,013$  y  $p = 0,038$ , respectivamente). El marcador *afa/dra* no se detectó en ninguna cepa. De hecho, la baja prevalencia de este marcador ha sido descrita con anterioridad en aislados de pollos sanos y enfermos, sugiriéndose un papel poco importante de estas adhesinas en la patogénesis de la colisepticemia (Stordeur *et al.*, 2002; McPeacke *et al.*, 2005).

En cepas avícolas, los marcadores *iutA*, *papC*, *kpsM II*, *papAH* y *sfa/foc* fueron identificados en un 42,2%, 14,1%, 12,5%, 3,1% y 1,6%, respectivamente. Estos valores

son muy similares a los descritos en un estudio anterior realizado en cepas procedentes de carne de pollo (Johnson *et al.*, 2003a).

**Tabla 3.6.** Distribución de la resistencia y de la virulencia de las cepas de *E. coli*.

Características	Grupo filogenético (%) <sup>a</sup>			
	A (n = 39)	B1 (n = 33)	B2 (n = 6)	D (n = 28)
Grupo CTX-M-9	9 (23,1)	16 (48,5)	5 (83,3)*	11 (39,3)
Grupo CTX-M-1	17 (43,6)*	8 (24,2)	1 (16,7)	5 (17,9)
SHV	8 (20,5)	4 (12,1)	0	6 (21,4)
TEM	0	2 (6,1)	0	0
CMY-2	5 (12,8)	3 (9,1)	0	6 (21,4)
Mediana de resistencias a antibióticos no β-lactámicos	3 <sup>(*)</sup>	5	6	5*
NAL <sup>R</sup>	23 (59,0) <sup>(*)</sup>	26 (78,8)	4 (66,7)	28 (100)*
CIP <sup>R</sup>	5 (12,8) <sup>(*)</sup>	14 (42,4)	0	15 (53,6)*
Mediana de factores de virulencia	0	0*	1	1*
<i>papAH</i>	0	1 (3)	0	2 (7,1)
<i>papC</i>	2 (5,1)	0 <sup>(*)</sup>	3 (50)*	5 (17,9)
<i>sfa/foc</i>	1 (2,6)	0	0	1 (3,6)
<i>afa/dra</i>	0	0	0	0
<i>iutA</i>	9 (23,1)	7 (21,2)	1 (16,7)	13 (46,4)*
<i>kpsM</i> II	5 (12,8)	0 <sup>(*)</sup>	1 (16,7)	7 (25)*
ExPEC	3 (7,7)	0 <sup>(*)</sup>	1 (16,7)	6 (21,4)*

<sup>a</sup> valor *p* fruto de la comparación de los grupos indicados con el resto de grupos. \*  $p < 0,05$ . <sup>(\*)</sup> El asterisco entre parentesis indica las asociaciones negativas.

Por otra parte, estos factores de virulencia se detectaron únicamente en 7 cepas procedentes de granjas de cerdos con la siguiente distribución: *kpsM* II (7,7%), *iutA* (5,1%), *papAH* (2,6%) y *sfa/foc* (2,6%). En las tres cepas aisladas de granjas de conejos, sólo se detectaron el alelo *papC* y el gen *iutA* en una cepa, y el gen *kpsM* II en dos cepas.

De acuerdo con la hipótesis inicial, solamente 10 de las 106 cepas de *E. coli* estudiadas (9,4%) fueron identificadas como ExPEC por presentar, al menos, 2 de los 5 determinantes de virulencia (Johnson *et al.*, 2003a). De ellos, los genes *iutA* y *kpsM* II fueron los más frecuentes, detectándose en un 90% y en un 80% de las cepas, respectivamente (Tabla 3.7). Ocho de las 10 cepas ExPEC procedieron de granjas de aves y, por primera vez, se describieron 2 cepas ExPEC obtenidas de granjas de conejos. Este último dato fue especialmente significativo teniendo en cuenta el bajo número de cepas aisladas de este ambiente ( $n = 3$ ) ( $p = 0,033$ ). Es destacable el hecho de que ninguna cepa ExPEC se aisló de granjas de porcino ( $p = 0,003$ ). Respecto al origen filogenético de estas cepas y, a diferencia de estudios anteriores (Picard *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003a,b), sólo una

cepa ExPEC derivó del grupo B2 y la mayoría se asociaron al grupo D. Pese al bajo número de cepas ExPEC descritas, es muy significativo el hecho de que seis de las mismas porten la enzima CMY-2 ( $p = 0,001$ ).

Finalmente, se determinó el serogrupo de las diez cepas ExPEC y si contenían algún factor de virulencia adicional (Tabla 3.7). Como puede observarse en la Tabla 3.7, un 30% de las cepas portaron el antígeno O2, estando todas ellas asociadas al grupo D. Este antígeno O2, junto con el O8, presente en una cepa ExPEC, ha sido identificado en cepas septicémicas de pollos (Blanco *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2003). Una cepa presentó el antígeno O109, el cual, junto con los antígenos O2 y O45 han sido descritos en cepas de *E. coli* productoras de toxinas en pollos (Truscott, 1973). El resto de antígenos identificados fueron O6, O15 y O25.

Con referencia a los 13 factores de virulencia adicionales estudiados, las cepas ExPEC presentaron diferentes combinaciones de los mismos. Los genes *fimC*, *cgsA* y *crl*, involucrados en la colonización y adhesión a los tejidos, fueron identificados en todas las cepas ExPEC. El factor *iucD*, implicado en la captación de hierro, se detectó en un 90% de las cepas. El gen *tsh*, relacionado con la colisepticemia en aves (Maurer *et al.*, 1998; Delicato *et al.*, 2003), ha sido descrito con una alta incidencia en cepas aisladas de aves sanas (McPeacke *et al.*, 2005). En este trabajo, un 80% de las cepas ExPEC presentaron dicha hemaglutinina. Los genes *fyuA*, *malX*, *irp2*, *iroC*, *cvaC* e *iss* se detectaron en un número de cepas igual o inferior a 4. Finalmente, ninguno de los genes que codifican las hemolisinas *hlyA* y *hlyE* fue detectado.

Varios estudios han sugerido que las cepas ExPEC de origen clínico y resistentes a quinolonas son menos virulentas que las cepas sensibles a estos antimicrobianos (Vila *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2003b; Horcajada *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2006). De acuerdo con ello, en el presente estudio, la única cepa ExPEC sensible al ácido nalidixico derivó del grupo filogenético B2 y fue portadora del mayor número de factores de virulencia. Sin embargo y de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio anterior realizado con cepas procedentes de carne de pollo (Johnson *et al.*, 2003a), no se observaron diferencias significativas entre el estatus ExPEC/no ExPEC y la resistencia al ácido nalidixico y/o a la ciprofloxacina.



A pesar de que los análisis filogenéticos de las cepas productoras de BLEE y CMY-2 aisladas de granjas de animales muestran una pertenencia a los filogrupos típicamente descritos en cepas comensales, no puede obviarse que un porcentaje nada despreciable de las cepas avícolas deriven de los filogrupos B2 y D. Esto, junto con el hecho de que la mayoría de las cepas ExPEC proceden de granjas de aves, sugiere que éstas podrían ser potenciales patógenos animales y humanos.

### **3.3 Identificación y caracterización de los plásmidos portadores de BLEE y de $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C**

Para abordar este objetivo se estudió, en primer lugar, la transmisibilidad de las BLEE y de las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C mediante conjugación. Ello permitió obtener cepas transconjugantes portadoras de plásmidos que codificaban dichas  $\beta$ -lactamasas, para proceder seguidamente a determinar el tamaño de dichos plásmidos así como a identificar el grupo de incompatibilidad al cual pertenecían.

#### **3.3.1 Estudios de transmisibilidad**

De un total de 446 cepas de enterobacterias [*E. coli* (n = 417), *K. pneumoniae* (n = 14), *K. oxytoca* (n = 2), *S. enterica* (n = 5), *E. cloacae* (n = 5), *P. mirabilis* (n = 2) y *C. freundii* (n = 1)], procedentes de las granjas de animales (véase apartado 3.1) y de otros ambientes (Mesa, 2007), se seleccionaron 111 en atención al número total de cepas aisladas de cada ambiente, a la prevalencia de las  $\beta$ -lactamasas en cada ambiente y a su patrón de resistencia a antimicrobianos no  $\beta$ -lactámicos.

La Tabla 3.8 resume las enzimas que portan las cepas seleccionadas de cada ambiente. En su gran mayoría estas cepas fueron *E. coli*, a excepción de las indicadas en las Tablas 3.10 a 3.15.

**Tabla 3.8.** BLEE y CMY-2 codificadas en las cepas seleccionadas para los estudios de transmisibilidad.

<b>Origen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Número de cepas (n = 111)</b>
<b>Animales</b> (n = 24)	CMY-2	4
	CTX-M-1	6
	CTX-M-1 + SHV-2	1
	CTX-M-32	1
	CTX-M-14a	4
	CTX-M-14b	1
	CTX-M-14b + CTX-M-1	1
	CTX-M-9	2
	CTX-M-9 + SHV-5	1
	SHV-5	1
	SHV-12	2
<b>Alimentos</b> (n = 3)	CTX-M-14a	2
	CTX-M-14a + CTX-M-3	1
<b>Aguas residuales</b> (n = 15)	CTX-M-32	1
	CTX-M-14a	5
	CTX-M-9	6
	CTX-M-51	1
	SHV-12	2
<b>Brotos alimentarios</b> (n = 14)	CTX-M-32	1
	CTX-M-14a	7
	CTX-M-14b	2
	CTX-M-9	2
	SHV-12	1
	TEM-52	1
<b>Muestras clínicas</b> (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) (n = 19)	CTX-M-1	1
	CTX-M-15	1
	CTX-M-32	1
	CTX-M-14a	10
	CTX-M-14b	1
	CTX-M-9	2
	SHV-12	2
	SHV-2	1
<b>Muestras clínicas</b> (Hospital Vall d'Hebron) (n = 20)	CTX-M-14a	12
	CTX-M-14b	2
	CTX-M-9	4
	SHV-12	2
<b>Portadores fecales</b> (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) (n = 12)	CMY-2	2
	CTX-M-10	1
	CTX-M-14a	4
	CTX-M-14b	1
	CTX-M-14a + SHV-12	1
	CTX-M-9	2
	SHV-12	1
<b>Portadores fecales</b> (Hospital Vall d'hebron) (n = 4)	CTX-M-15	1
	CTX-M-14a	1
	CTX-M-14b	1
	CTX-M-9	1

Seguidamente, se estudió si las BLEE o  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C que portaban las cepas seleccionadas eran transferibles mediante conjugación. Para ello, se realizaron conjugaciones biparentales. De cada conjugación, se aislaron tres clones al azar y se eligió uno de ellos para posteriores estudios si los tres clones presentaban el mismo patrón de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos. No obstante, en conjugaciones realizadas desde 5 cepas donadoras (4 de granjas de animales y 1 de muestras clínicas del Hospital Vall d'Hebron), 2 de los 3 transconjugantes seleccionados mostraron distintos patrones de resistencia a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos. En estos casos, se estudiaron los 2 transconjugantes de forma independiente.

Como puede observarse en la Tabla 3.9, el porcentaje de plásmidos conjugativos portadores de BLEE y CMY-2 fue superior al 70% en la mayoría de los ambientes. En cambio, este porcentaje fue algo inferior en las cepas aisladas de portadores fecales de los dos hospitales estudiados y en las muestras clínicas del Hospital Vall d'Hebron. En cualquier caso, y a pesar de las diferencias entre ambientes, el porcentaje total de cepas capaces de transferir por conjugación estas resistencias fue del 75,7%, lo cual está de acuerdo con la hipótesis de que la creciente difusión de dichas resistencias se debe a que muchas de ellas se hallan codificadas en plásmidos autotransferibles. Además, en este punto debe también considerarse que las frecuencias de conjugación fueron en muchos casos elevadas, en particular, en las cepas aisladas de granjas, de alimentos y de portadores fecales (Tabla 3.9). Frecuencias similares han sido descritas para cepas de origen clínico (Novais *et al.*, 2006).

Respecto al tipo de enzima transferida, cabe destacar que las enzimas de la **familia CTX-M** se vehiculan, en su gran mayoría, a través de plásmidos transmisibles. Así, el 100% de las enzimas **CTX-M-1** (n = 9) se transfirieron por conjugación, así como las dos únicas enzimas **CTX-M-10** y **CTX-M-51** estudiadas. Las enzimas **CTX-M-32** (n = 4), **CTX-M-15** (n = 2) y **CTX-M-9** (n = 20) presentaron frecuencias del 75%, 50% y 45%, respectivamente.

**Tabla 3.9.** Transmisibilidad de BLEE y CMY-2 por conjugación.

Origen	No. cepas seleccionadas (No. cepas totales)	No. cepas que conjugaron (%)	Frecuencias de conjugación
Granjas	24 (107)	20 (83,3)	$1,7 \times 10^{-3}$ - $1,18 \times 10^{-2}$
Alimentos	3 (3)	3 (100)	$5,4 \times 10^{-3}$ - $3 \times 10^{-2}$
Muestras clínicas			
Hospital Santa Creu i Sant Pau	19 (73)	16 (84,2)	$4,4 \times 10^{-6}$ - $1,4 \times 10^{-2}$
Hospital Vall d'Hebron	20 (83)	13 (65)	$8,9 \times 10^{-6}$ - $2,1 \times 10^{-2}$
Portadores fecales			
Hospital Santa Creu i Sant Pau	12 (52)	8 (66,6)	$9,3 \times 10^{-6}$ - $2,3 \times 10^{-3}$
Hospital Vall d'Hebron	4 (29)	2 (50)	$1,25 \times 10^{-3}$ - $2,05 \times 10^{-2}$
Brotos alimentarios	14 (66)	11 (78,6)	$9,8 \times 10^{-5}$ - $2,5 \times 10^{-2}$
Aguas residuales	15 (33)	11 (73,3)	$3,8 \times 10^{-6}$ - $1,3 \times 10^{-2}$
TOTAL	<b>111</b>	<b>84</b>	

Se ha analizado también la transmisibilidad de la enzima **CTX-M-14a** y de su variante recientemente descrita, la **CTX-M-14b** (Navarro *et al.*, 2007) (Tabla 3.8). La secuencia génica de esta última enzima tiene los mismos entornos genéticos que el gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub> y los genes que codifican ambas proteínas presentan un 99% de homología. Por ello, se ha sugerido que la enzima CTX-M-14b deriva por mutación de la CTX-M-9. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el 22% de las enzimas CTX-M-14b (n = 9) se halla en plásmidos conjugativos. Este porcentaje es más cercano al de las enzimas CTX-M-9 (45%) que al de las CTX-M-14a (85,1%)

Respecto al resto de enzimas estudiadas, la única enzima **TEM-52** incluida en el estudio también se transfirió, al igual que las enzimas de la familia **SHV** (n = 15), las cuales lo hicieron en un 80%. De igual modo, las enzimas **CMY-2** (n = 6) fueron transmisibles en un 83,3% de los casos.

La transmisión por conjugación de resistencias asociadas a BLEE y CMY-2 ha sido descrita con anterioridad por varios autores (Hopkins *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Novais *et al.*, 2007). En este trabajo, un 35,7% de las cepas transconjugantes

que contenían un solo plásmido presentaron también resistencias a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos probados. Cabe destacar el hecho de que en un 50% de los casos estaban asociados a la enzima CMY-2 presentando como mínimo 3 marcadores de resistencia adicionales. Resultados similares se han reportado también en otros trabajos (Garau *et al.*, 1999; Winokur *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2004).

### 3.3.2 Caracterización del tamaño y del grupo de incompatibilidad de los plásmidos conjugativos portadores de BLEE y de CMY-2

Una vez identificadas las enzimas BLEE y las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de clase C y determinado el patrón de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos en las cepas transconjugantes, se procedió a caracterizar los plásmidos que codificaban dichas  $\beta$ -lactamasas. Este estudio consistió en determinar el peso molecular del plásmido y en identificar su grupo de incompatibilidad.

El peso molecular de los plásmidos se estudió mediante electroforesis en campo pulsante, previa digestión de su DNA con la endonucleasa *S1*. Para la identificación del grupo de incompatibilidad se utilizó la siguiente estrategia. En primer lugar, se identificó de forma presuntiva el grupo Inc mediante hibridación por *dot blot* del DNA plasmídico con sondas frías específicas de dieciséis grupos de incompatibilidad (Couturier *et al.*, 1988). Posteriormente, los geles de campo pulsante, empleados en la determinación del peso molecular de los plásmidos, se transfirieron a membranas de nailon y se hibridaron con las sondas que habían sido positivas en los experimentos de *dot blot*. Finalmente, estas membranas se deshibridaron y se rehibridaron de nuevo con sondas específicas para las enzimas BLEE y CMY-2 (Miró *et al.*, 2005) para determinar cuales de los plásmidos conjugativos eran portadores de las enzimas.

Para disponer de las dieciséis sondas específicas de los grupos Inc B/O, com9, FIA, FIB, FII, HI1, HI2, II, L/M, N, P, Q, U, W, X e Y, se partió de los trabajos realizados por el grupo de M. Couturier en 1988. Como se ha indicado en la introducción de esta memoria, dichos trabajos consistieron en clonar las regiones *inc/rep* de dieciséis plásmidos tipo (pULB) en el vector pBR322 (Tabla 2.2). En la metodología desarrollada por M. Couturier, para obtener las sondas *inc/rep* es necesario digerir cada plásmido con una o dos

enzimas de restricción y recuperar posteriormente el fragmento de DNA que contiene la región deseada. Al realizar esta aproximación, nos encontramos con que el rendimiento era muy bajo, lo cual dificultaba la obtención de la sonda en suficiente cantidad como para marcarla mediante el método de marcaje *random primer* (Feinberg y Vogelstein, 1983) con digoxigenina y utilizarla en hibridaciones por *dot blot*. Por ello, y con el objetivo de mejorar el rendimiento de obtención las sondas, se amplificaron las secuencias de las sondas *rep B/O*, *9*, *FIIA*, *FIB*, *HI2*, *II*, *L/M* y *Q* desde los plásmidos tipo pULB2406, pULB2422, pULB2401, pULB2404, pULB2433, pULB2428, pULB2423 y pULB2424, respectivamente. Para ello, se emplearon cebadores complementarios al lugar de clonación de las sondas en el vector pBR322 (véase apartado 2.6.2). En cambio, los determinantes de incompatibilidad de los grupos Inc W, U y HI1 se obtuvieron mediante digestión de los plásmidos pULB2426, pULB2429 y pULB2436, respectivamente, utilizando las dianas de clonación de sus secuencias en el vector pBR322. De esta forma, se aislaron los fragmentos de 1.156, 955 y 2.211 bp que contenían las secuencias deseadas.

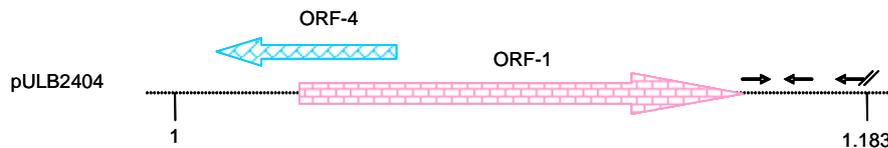
Todos los fragmentos de DNA obtenidos, ya sea por amplificación o por digestión, se ligaron al vector pGEM<sup>®</sup>-T y se secuenciaron. Una vez conocidas las secuencias de las regiones *inc/rep* de interés se pudieron diseñar cebadores específicos para cada uno de estos grupos Inc (Tabla 2.3). En el caso de las sondas *rep FIA*, *X*, *P*, *N* e *Y*, pudieron diseñarse cebadores específicos dado que se disponía de las secuencias publicadas de los plásmidos tipo pULB2154, pULB2405, pULB2420, pKM101 y P1, respectivamente (Tabla 2.3). Los productos de amplificación de las dieciséis sondas se clonaron finalmente en pGEM<sup>®</sup>-T y se secuenciaron para confirmar que las secuencias correspondían a las regiones *inc/rep* descritas [*repB/O* (no. acceso M93062), *repFIA* (Murotsu *et al.*, 1981), *repFIIA* (Ryder *et al.*, 1982), *repFIB* (Saul *et al.*, 1989), *repHII* (Sherburne *et al.*, 2000), *repHI2* (Gilmour *et al.*, 2004), *repII* (no. acceso AP005147), *repL/M* (Athanasopoulos *et al.*, 1995), *repN* (no. de acceso U72482), *repP* (Stalker *et al.*, 1981), *repQ* (Meyer *et al.*, 1985), *repU* (Rhodes *et al.*, 2004), *repW* (Okumura y Kado, 1992), *repX* (Stalker *et al.*, 1982), *repY* (Ábeles *et al.*, 1984) y *rep9* (Couturier *et al.*, 1988)]. El análisis de las secuencias se describe a continuación.

➤ Sonda *repFIA*



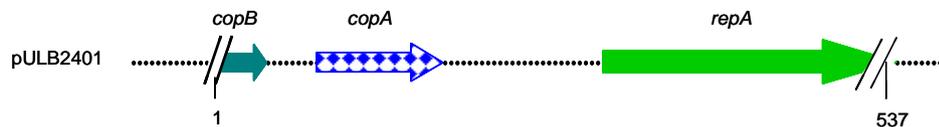
Contiene 4 secuencias repetidas de 19 pb del IncB y los primeros 695 pb del gen *repE* que codifica la proteína RepE de inicio de replicación.

➤ Sonda *repFIB*



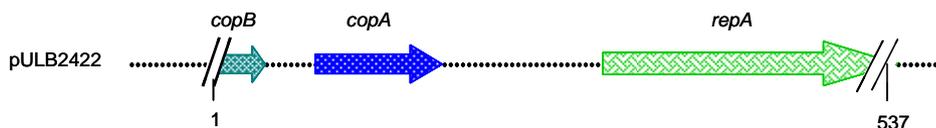
Contiene la región mínima para el inicio de replicación, el ORF-1 esencial para el inicio de replicación del replicón RepFIB, el ORF-4 y dos secuencias repetidas de 21 pb y parte de una tercera.

➤ Sonda *repFIIA*



Contiene las últimas 19 pb del gen *copB*, 91 pb que codifican el RNA CopA y 226 pb de los 858 pb que codifican la proteína RepA.

➤ Sonda *rep9*



Contiene las 19 pb finales del gen *copB*, una secuencia de 87 pb similar a los 91 pb del RNA CopA y 230 pb similares al inicio del gen *repA* del plásmido R1. Esta secuencia es 100% idéntica a su plásmido de origen, el pIP71, el cual ha sido

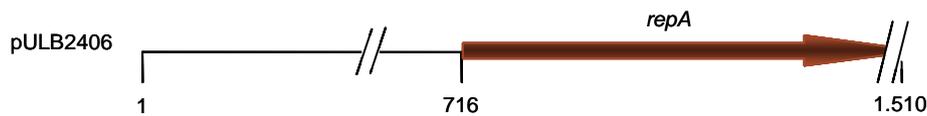
secuenciado recientemente por el instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Plasmids/>).

➤ Sonda *repII*



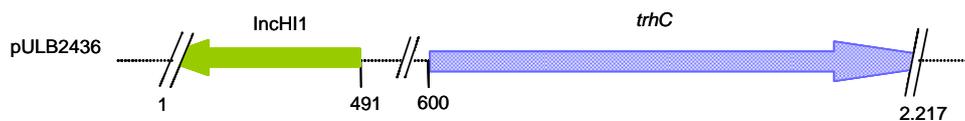
Contiene la secuencia íntegra que codifica la proteína RepY y 264 aminoácidos de los 344 de la proteína RepZ. Ambas proteínas están involucradas en el inicio de la replicación del plásmido R64.

➤ Sonda *repB/O*



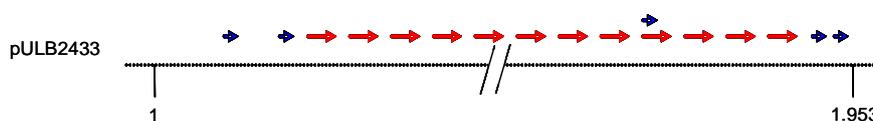
Contiene 265 aminoácidos de los 343 de la proteína RepA de inicio de replicación del plásmido pMU707.

➤ Sonda *repHI1*



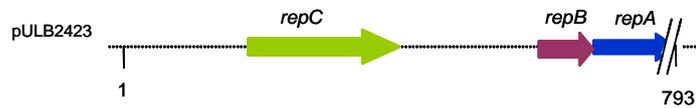
Contiene 491 pb del *IncHI1* del plásmido R27 y 537 aminoácidos de los 893 de la proteína *TrhC* (no. de acceso AF250878).

➤ Sonda *repHI2*



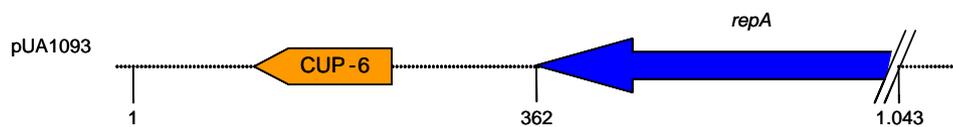
Contiene 12 secuencias repetidas de 80 a 81 pb más 5 secuencias repetidas de 35 a 46 pb presentes en el origen de replicación del plásmido R478.

➤ Sonda *repL/M*



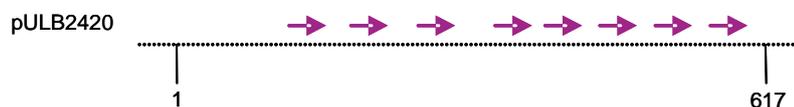
Contiene los genes *repC*, *repB* y los primeros 36 aminoácidos de los 351 de la proteína RepA.

➤ Sonda *repN*



Esta sonda se construyó a partir de la clonación de un fragmento de 1.043 pb del plásmido pKM101 del grupo IncN (no. de acceso U72482). Contiene una de las 6 copias de elementos repetitivos altamente conservados presentes en el pKM101 (CUP: *Conserved UPstream*), relacionados con el control del regulón donde se localizan.

➤ Sonda *RepP*



Contiene 8 repeticiones directas de 17 pb, 5 de las cuales forman parte del origen de replicación del RK2.

➤ Sonda *repQ*



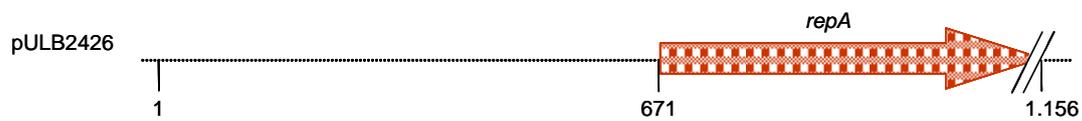
Contiene 3 repeticiones directas completas y parte de una cuarta, todas ellas involucradas en el control del inicio de la replicación del plásmido R1162.

➤ Sonda *repU*



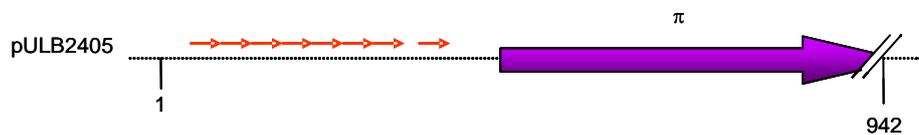
Contiene 178 aminoácidos de los 459 de la proteína RepA de inicio de la replicación del plásmido.

➤ Sonda *repW*

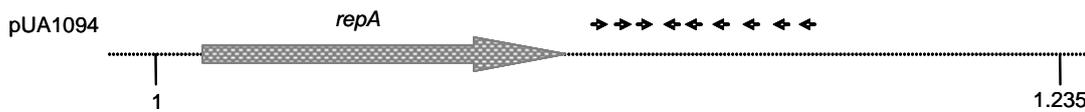


Contiene 162 aminoácidos de los 324 de la proteína RepA de inicio de replicación del plásmido pSa.

➤ Sonda *repX*



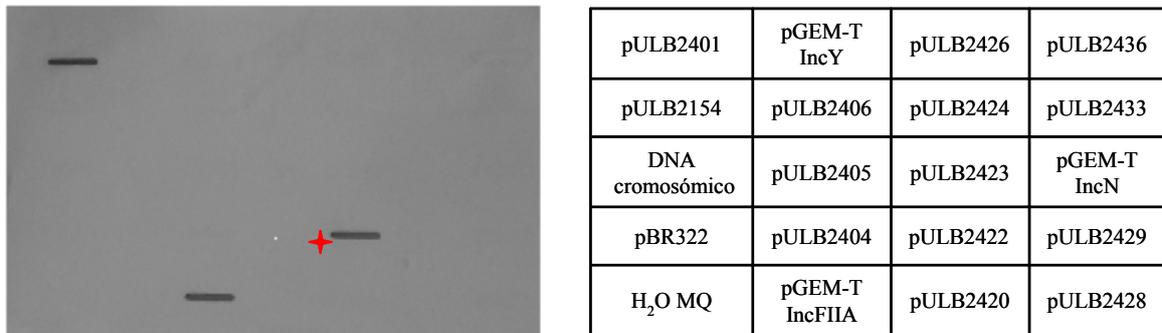
Contiene 8 secuencias repetidas de 22 pb y 161 aminoácidos de los 305 de la proteína de inicio de replicación  $\pi$  del plásmido RK6.

➤ Sonda *repY*

Contiene 9 repeticiones directas de 19 pb. Cinco de ellos, forman parte del origen de replicación del plásmido RK2 junto con el gen *repA* de 860 pb.

De esta forma, utilizando los cebadores indicados en la Tabla 2.3, se obtuvo la cantidad de sonda necesaria sin las dificultades inherentes a la metodología utilizada por M. Couturier y colaboradores (Couturier *et al.*, 1988).

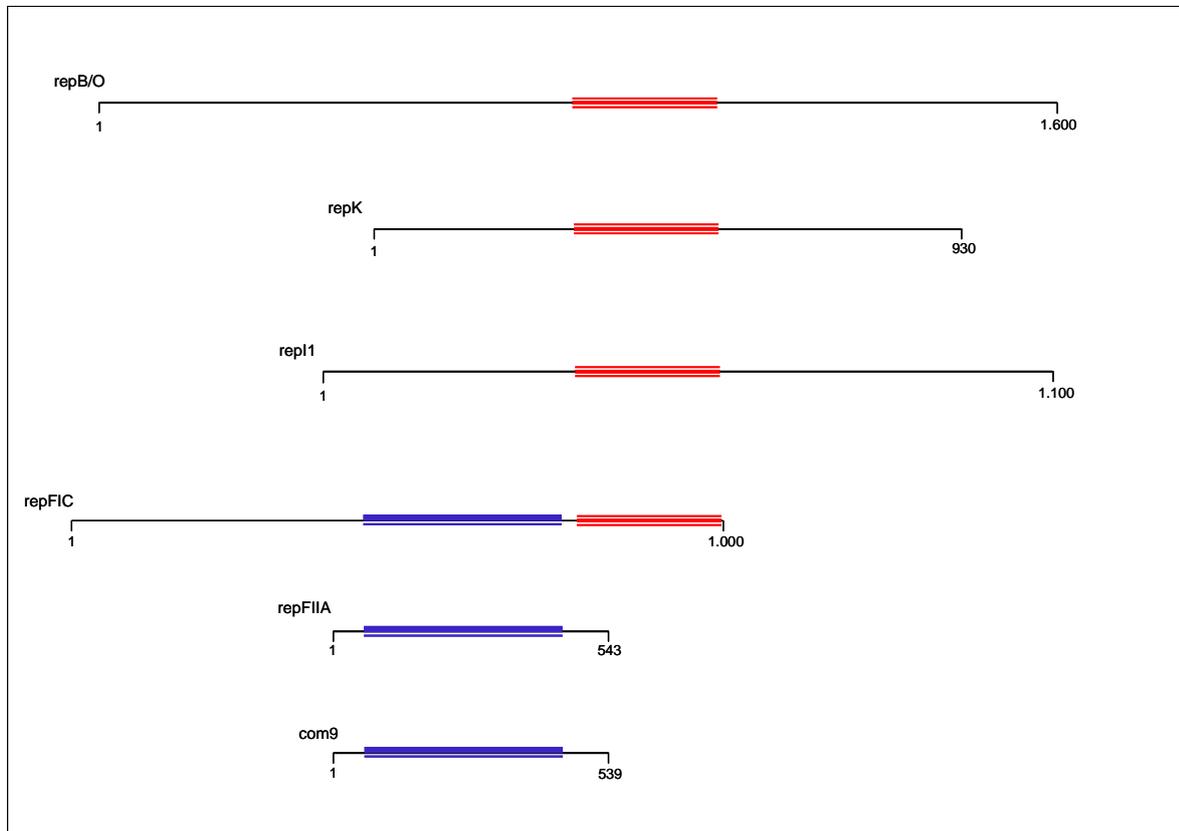
La especificidad y sensibilidad de las sondas se comprobó al utilizarlas frente a los plásmidos tipo en experimentos de hibridación mediante *dot blot*. Éstos sirvieron, además, para poner a punto el método de marcaje e hibridación con sondas frías. En ningún caso se observó hibridación cruzada, a excepción de la sonda *repFIIA*, la cual hibridó con el plásmido pULB2422 del grupo com9 (Figura 3.4). También pudo comprobarse que la sonda *repII* hibridaba con el plásmido pULB2406 del grupo IncB/O.



**Figura 3.4.** *Dot-Blot* empleando la sonda *repFIIA* (pULB2401) y los plásmidos tipo, cuya posición se detalla en la tabla contigua. Se indica con un asterisco la señal positiva del grupo com9 (pULB2422) al ser enfrentado con la sonda *repFIIA*.

Estos resultados eran esperables dado que hibridaciones cruzadas entre las sondas *repFIIA*, *rep9* y *repFIC* así como entre *repFIC*, *repII*, *repB/O* y *repK*, ya habían sido descritas con anterioridad por Couturier y colaboradores. De hecho, pudimos comprobar

mediante estudios *in silico* que todas estas sondas presentaban regiones 100% idénticas (Figura 3.5), lo cual explicaría el hecho de que se obtengan hibridaciones cruzadas entre ellas.



**Figura 3.5.** Representación gráfica de las seis sondas que presentan hibridaciones cruzadas. En rojo (≡) se señala la zona de similitud entre las sondas *repB/O*, *repI1*, *repK* y *repFIC*. En azul (≡) se señala la zona de similitud entre las sondas *repFIC*, *repFIIA* y *rep9*.

Para poder identificar los grupos Inc de aquellos plásmidos que habían hibridado con sondas de baja especificidad, se procedió a amplificar mediante PCR las regiones *inc/rep*. En el caso de los plásmidos que hibridaron con la sonda *repI1*, se utilizaron los cebadores específicos de los grupos IncI1, IncB/O, IncK e IncFIC y en el caso de los plásmidos que lo hicieron con la sonda *repFIIA*, se emplearon los cebadores FrepB y repFIC, todos ellos descritos por Carattoli *et al.*, (2005b).

Cabe destacar que los cebadores descritos como específicos en la bibliografía para los grupos IncI1, IncB/O e IncK no mostraron tal especificidad. Por ello, se procedió a secuenciar los fragmentos amplificados. El análisis de las secuencias obtenidas indicó que todos estos plásmidos presentan un 99% de similitud con la región *inc/rep* del plásmido de referencia R387 del grupo IncK, a excepción de dos de ellos que resultaron pertenecer al grupo IncI1.

Por lo que hace referencia a los plásmidos que hibridaron la sonda *repFIIA* de baja especificidad, únicamente se obtuvieron productos de amplificación con los cebadores FrepB. La secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos mostró que las secuencias eran 100% idénticas a la sonda *repFIIA*, por lo que todos ellos pertenecen al grupo IncFII. Estudios recientes han dividido el grupo IncFII en dos subgrupos. El IncFII(1) cuyo plásmido de referencia es el NR1 (no. acceso X02302) y el IncFII(2) cuya referencia es el plásmido pRSB107 (no. acceso AJ851089) (Hopkins *et al.*, 2006). Dado que las secuencias obtenidas mostraron una similitud del 100% con la región CopA del plásmido NR1 se clasificaron estos plásmidos como IncFII(1).

Por otra parte, en este trabajo también se ha tenido en cuenta que varios autores habían descrito la presencia de replicones vestigiales o secundarios IncQ en plásmidos IncA/C (Couturier *et al.*, 1988; Llanes *et al.*, 1994). Según esto, era posible que aquellos plásmidos que habían hibridado con la sonda *repQ*, contuvieran replicones IncA/C. Para averiguarlo, se utilizaron cebadores específicos del grupo IncA/C y se secuenciaron los productos obtenidos mediante PCR (Carattoli *et al.*, 2005b). El análisis de las secuencias mostró que en todos los casos estaba presente parte del replicón A/C. Por otra parte y, al igual que lo comentado para el grupo IncFII, también existe una variante del replicón IncA/C, denominada IncA/C<sub>2</sub> (Hopkins *et al.*, 2006), cuyo plásmido de referencia es el p2039. Al compararse las secuencias de los fragmentos de DNA secuenciados con la secuencia IncA/C<sub>2</sub> se determinó que la totalidad de plásmidos caracterizados como IncQ portaban también un segundo replicón IncA/C<sub>2</sub>.

Aplicando la estrategia comentada anteriormente se ha conseguido identificar y caracterizar el grupo Inc de un 80,9% (n = 68) de los plásmidos que codifican BLEE y CMY-2. En las Tablas 3.10 a 3.15 se detallan los resultados obtenidos sobre la

caracterización de los plásmidos para cada ambiente y seguidamente se comentan dichos resultados atendiendo a cada familia o grupo de  $\beta$ -lactamasas (Figura 3.6).

### **Enzimas del grupo CTX-M-9**

Los plásmidos conjugativos ( $n = 9$ ) portadores de la enzima **CTX-M-9** presentaron tamaños muy diversos (96-468 Kb) y su grupo de incompatibilidad se determinó en un 77,8% de los casos. Estos plásmidos pertenecen a un variado número de grupos de incompatibilidad (IncHI2, IncI1, IncK, IncN e IncP) (Figura 3.6), destacando la presencia de dos replicones (IncI1 e IncP) en uno de los plásmidos portadores de esta enzima (Tabla 3.13). Otros trabajos han descrito también enzimas CTX-M-9 en plásmidos IncI1 e IncP en cepas clínicas (Novais *et al.*, 2006). Sin embargo, la gran mayoría de estudios asocian a los plásmidos que codifican esta enzima con el grupo HI2 (Hopkins *et al.*, 2006; García *et al.*, 2007; Novais *et al.*, 2007). Respecto a esto último cabe destacar que tres de los nueve plásmidos caracterizados pertenecieron a este grupo Inc.

Por otra parte, cabe destacar que desde la cepa donadora GOC012 se obtuvieron dos cepas transconjugantes con un patrón de resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos diferente (Tabla 3.10). En una de ellas se identificó un plásmido IncK de 96 Kb que codificaba la enzima CTX-M-9. El perfil plasmídico de la otra cepa mostró una banda del mismo tamaño, pero que hibrida con dos sondas Inc diferentes. Mediante secuenciación se determinó que en dicha banda se encontraban los determinantes de los grupos IncFII e IncK. Estos resultados conducen a pensar que esta cepa transconjugante debe contener dos plásmidos del mismo tamaño pertenecientes a dos grupos Inc diferentes, siendo el del grupo IncK el portador de la enzima.

La única enzima **CTX-M-51** estudiada, se hallaba codificada en un plásmido portador de dos replicones, IncFII e IncHI2 (Tabla 3.15).

La enzima **CTX-M-14a** se localizó en plásmidos conjugativos ( $n = 40$ ) con tamaños comprendidos entre 71 y 132 Kb. Pudo identificarse el grupo Inc de un 80% de los mismos, determinándose que todos ellos pertenecían al grupo IncK (Figura 3.6), a excepción de uno que fue del grupo IncI1 (Tabla 3.12) y de otro que presentó los

replicones IncFII e IncK (Tabla 3.10). Pese a que hay muy pocos trabajos hasta el momento sobre la tipificación de plásmidos que codifican la enzima CTX-M-14, se ha descrito uno de ellos, obtenido de ganado vacuno, que también pertenece al grupo IncK (Hopkins *et al.*, 2006). Finalmente, cabe señalar que sólo se pudo caracterizar el grupo Inc de uno de los dos plásmidos que codifican la enzima **CTX-M-14b**, el cual perteneció al grupo IncHI2. Este grupo Inc también se ha encontrado en otros plásmidos que codifican esta misma enzima y que fueron aislados de cepas clínicas (Navarro *et al.*, 2007). Nuestros resultados corroboran la hipótesis, anteriormente comentada, respecto al origen de la enzima CTX-M-14b desde la CTX-M-9, ya que esta enzima también suele vehiculizarse en plásmidos IncHI2 de alto peso molecular, al menos en clínica (García *et al.*, 2007).

### **Enzimas del grupo CTX-M-1**

La enzima **CTX-M-1** se identificó en plásmidos (n = 9) procedentes de cepas de granjas de animales (aves y conejos) y de muestras clínicas. Destaca el hecho de que todos los plásmidos son del grupo IncN (Figura 3.6) y de que presentan tamaños muy similares.

Los plásmidos conjugativos portadores de la enzima **CTX-M-32** (n = 3), procedieron de cepas de granjas de animales (aves y conejos), de muestras clínicas y de brotes alimentarios. Todos ellos pertenecieron también al grupo IncN (Figura 3.6), con tamaños muy similares a los descritos anteriormente para la enzima CTX-M-1. Esta relación entre las enzimas CTX-M-1 y CTX-M-32 con el grupo IncN también se ha encontrado en plásmidos procedentes de un hospital de Madrid (Novais *et al.*, 2007). El hecho de que ambas enzimas, que se diferencian únicamente en una sustitución aminoacídica (Cartelle *et al.*, 2004), se vehiculen en plásmidos de amplio espectro de hospedador como los IncN, debe facilitar su diseminación entre diferentes ambientes. No obstante, un estudio reciente describe a la enzima CTX-M-1 en plásmidos de origen avícola del grupo IncI1 (Girlich *et al.*, 2007).

Las únicas enzimas **CTX-M-10** y **CTX-M-15** estudiadas se aislaron de cepas procedentes de muestras fecales y se encontraron en plásmidos de 356 Kb y 57 Kb, respectivamente. Sólo pudo identificarse el grupo Inc de la segunda, el cual fue IncK (Tabla 3.13). Tanto el tamaño como el grupo Inc del plásmido portador de esta última enzima contrasta con los estudios realizados hasta el momento en cepas de origen clínico,

en los que se apunta a una transferencia horizontal de plásmidos IncFII con tamaños generalmente superiores a las 100 Kb como la principal causa de diseminación de esta enzima (Lavollay *et al.*, 2006; Novais *et al.*, 2007).

### **Otras enzimas BLEE**

El único plásmido estudiado portador de la enzima **TEM-52** procedía de una muestra de un brote alimentario, su tamaño fue de 45 Kb y no pudo determinarse su grupo Inc.

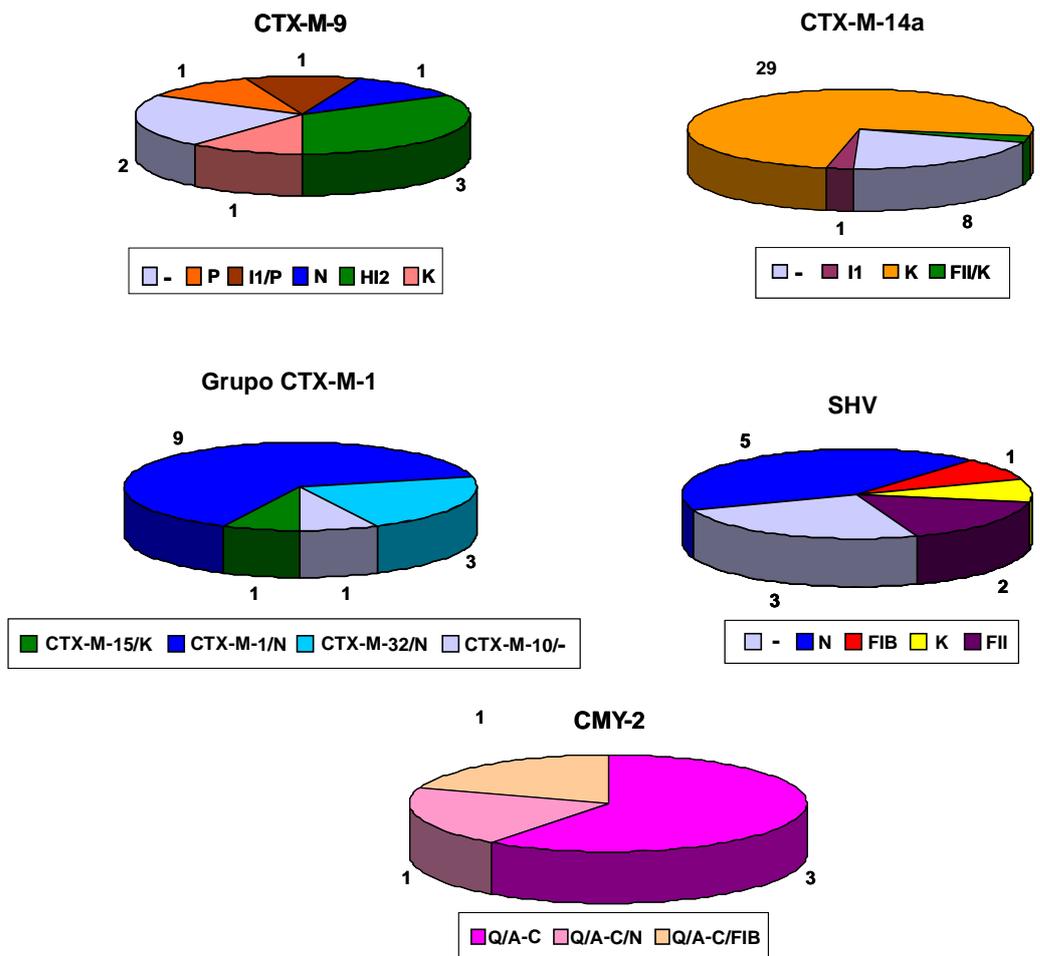
Los plásmidos conjugativos portadores de enzimas **SHV** (n = 12) presentaron tamaños comprendidos entre 36 y 181 Kb. Un 83,3% de los mismos codificaron la enzima SHV-12, la cual, al igual que en estudios anteriores (Carattoli *et al.*, 2006), se movilizó a través de plásmidos de tamaños y grupos de incompatibilidad diversos, aunque 4 de ellos pertenecieron al grupo IncN (Figura 3.6). Teniendo en cuenta que las SHV se identificaron en casi todos los ambientes estudiados, podría sugerirse que la amplia distribución de estas resistencias se debe a que se vehiculan a través de plásmidos de diversos grupos Inc de amplio espectro. Por ello, la variabilidad en los grupos Inc supondría una gran ventaja a la hora de favorecer la diseminación de estas resistencias entre diferentes habitats.

### **Cefamicinasa CMY-2**

Los plásmidos conjugativos portadores de la enzima **CMY-2** (n = 5), presentes en cepas de granjas de aves (Tabla 3.10) y en muestras fecales (Tabla 3.13), mostraron tamaños entorno a las 200 Kb, a excepción de dos de ellos, los cuales fueron de 91 y 374 Kb. En todos los casos, los plásmidos presentaron varios replicones, siendo el IncQ y el IncA/C<sub>2</sub> comunes a todos ellos (Figura 3.6). La presencia de dos o más replicones podría ser fruto de una cointegración de varios plásmidos, lo cual explicaría los elevados pesos moleculares que presentan. Respecto a estas enzimas, parece existir una universalidad en el tipo de plásmidos en que se vehiculan, ya que estudios anteriores han descrito plásmidos IncA/C<sub>2</sub> portadores del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> tanto en cepas de *E. coli* como de *Salmonella*, aisladas de hospitales y de la comunidad, procedentes de Estados Unidos, Italia y el Reino Unido (Carattoli *et al.*, 2006; Hopkins *et al.*, 2006). Estos resultados ponen de manifiesto la

importancia y el poder de diseminación que tienen ciertos plásmidos a pesar de las distancias geográficas existentes entre los diversos países.

El conjunto de los resultados obtenidos muestra una elevada capacidad de transmisión de plásmidos portadores de BLEE y CMY-2 procedentes de ambientes muy variados que actúan como un reservorio de estas resistencias. Además, parece existir un elevado grado de correlación entre el grupo Inc, el tamaño del plásmido y la  $\beta$ -lactamasa codificada por el mismo. Este hecho se muestra especialmente en el caso de alguna de estas enzimas (CTX-M-14a, CTX-M-1, CTX-M-32, CMY-2). Consecuentemente, podría especularse que el mecanismo de dispersión de dichas  $\beta$ -lactamasas podría deberse a la diseminación de plásmidos altamente transmisibles que podrían haber evolucionado a partir de plásmidos ancestrales de determinados grupos Inc.



**Figura 3.6.** Distribución de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos que codifican las BLEE y CMY-2 estudiadas. - no identificado.

**Tabla 3.10.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE y CMY-2 procedentes de cepas de enterobacterias de origen animal.

Granja	Cepa	Cepa donadora		Cepa transconjugante				Plasmido <sup>c</sup>
		Enzima	Resistencia a antibióticos no β-lactámicos <sup>b</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no β-lactámicos <sup>b</sup>	Número	Tamaño (Kb)	
Conejos	COC003	CTX-M-14a	NAL, SUL, TET	CTX-M-14a	-	2	100/54	K <sup>c</sup> /I <sup>c</sup>
		CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	TET	2	156/101	-/K <sup>c</sup>
	COC001 <sup>a</sup>	CTX-M-9	KAN, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CTX-M-1	-	1	42	N <sup>g</sup>
	COC004	CMY-2	CM, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, TET, TOB	CTX-M-1	-	2	103/46	FI <sup>h</sup> /N <sup>g</sup>
Cerdos	POC001	CTX-M-1	KAN, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CTX-M-1	-	2	383/44	-/N <sup>g</sup>
	POC002	CTX-M-1	TET	CTX-M-1	-	2	377/44	Q <sup>g</sup> /N <sup>g</sup>
	POC018	CTX-M-1	SUL, STR, SXT, TMP	CTX-M-1	SUL	2	42	N <sup>g</sup>
	POC020	CTX-M-1	CM, CIP, KAN, NAL, FZD, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-1	-	1	43	N <sup>g</sup>
	POC022	CTX-M-1	FZD, STR, TET, TMP	CTX-M-1	-	1	364/42	-/N <sup>g</sup>
	POC005	SHV-5	CM, NAL, STR, TET, TMP	SHV-5	-	2	43	N <sup>g</sup>
	POC034	SHV-12	CM, CIP, FZD, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TMP, TOB, TET	SHV-12	-	1	43	N <sup>g</sup>
Aves	GOC005	CTX-M-14a	CM, CIP, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	3	117/99/53	-/K <sup>c</sup> /-
	GOC025	CTX-M-14a	CM, CIP, NAL, SUL, TET	CTX-M-14a	CM, SUL	2	94/41	FI <sup>h</sup> y K <sup>c</sup> /FI <sup>h</sup>
	GOC059	CTX-M-14a	SUL, STR	CTX-M-14a	SUL	2	124/49	K <sup>c</sup> /-
	GOC006	CTX-M-14b	NAL, SSS, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	-	1	96	K <sup>c</sup>
	GOC012	CTX-M-9	CM, CIP, FZD, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	CM, SUL, TET	1	96 <sup>d</sup>	FI <sup>h</sup> y K <sup>c</sup>
	GOC010	CTX-M-9 + SHV 5	NAL, SSS, SXT, TET, TMP	CTX-M-1	SUL	1	45	N <sup>g</sup>
	GOC042	CTX-M-1+ SHV-2	SUL, TET	CTX-M-1	-	1	44	N <sup>g</sup>
	GOC044	CTX-M-1	CM, CIP, NAL, TET	CTX-M-1	-	1	40	N <sup>g</sup>
	GOC051	CTX-M-1 + CTX-M-14b	NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-1	SUL	2	354/40	Q <sup>g</sup> /N <sup>g</sup>
	GOC056	CTX-M-32	CM, CIP, NAL, SUL, STR, TET	CTX-M-32	-	1	43	N <sup>g</sup>
	GOC063	SHV-12	CIP, NAL, TMP	SHV-12	-	2	81/35	FI <sup>h</sup> /-
	GOC001	CMY-2	CM, CIP, NAL, SUL, STR, TET	CMY-2	CM, SUL, TET	1	91	Q <sup>g</sup> y A/C <sup>e</sup>
	GOC007	CMY-2	CM, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP, TOB	CMY-2	KAN, GEN, TOB, CM, SUL, TET	1	200	Q <sup>g</sup> , A/C <sup>e</sup> y N <sup>g</sup>
	GOC032	CMY-2	CM, GEN, KAN, SUL, STR, TET, TOB	CMY-2	KAN, GEN, TOB	1	204	Q <sup>g</sup> y A/C <sup>e</sup>

<sup>a</sup> *E. cloacae*. <sup>b</sup> Cloramfenicol (CM), ciprofloxacina (CIP), furazolidona (FZD), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), ácido nalidíxico (NAL), nitrofurantoina (NT), estreptomina (STR), sulfonamida (SUL), tetraciclina (TET), tobramicina (TOB), trimetoprim (TMP), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT). <sup>c</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE o CMY-2 se señalan en negrita. <sup>d</sup> Este caso se comenta en el texto (pág 118). <sup>e</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>f</sup> - No identificado. <sup>g</sup> Grupo Inc identificado por *Southern*. Se señala en sombreado las cepas que no conjugaron.

**Tabla 3.11.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE procedentes de cepas de enterobacterias aisladas de alimentos.

Cepa	Cepa donadora			Cepa transconjugante		
	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>b</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>b</sup>	Número	Plásmido <sup>c</sup>
A4C0011A	CTX-M-14a	CM, CIP, NAL, NT, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2	101/47
A4C0012A	CTX-M-14a	CM, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2	103/48
A4C0021A <sup>a</sup>	CTX-M-14a + CTX-M-3	CM, CIP, NAL, NT, SUL, SXT, TMP	CTX-M-14a	-	2	132/50

<sup>a</sup> *K. pneumoniae*. <sup>b</sup> Las abreviaturas de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se especifican en el pie de la Tabla 3.10. <sup>c</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE se señalan en negrita. <sup>d</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>e</sup> – No identificado.

**Tabla 3.12.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE procedentes de cepas de enterobacterias aisladas de muestras clínicas.

Cepa	Cepa donadora			Cepa transconjugante		
	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>
						Número Tamaño (Kb) Grupo Inc
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau						
EIC0251A	CTX-M-14a + TEM	NAL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2	90/52 K <sup>i</sup> / <sub>2</sub> <sup>h</sup>
EIC0271A	CTX-M-14a	NAL, TET	CTX-M-14a	-	2	92/42 K <sup>i</sup>
EIC0281A	CTX-M-14a + TEM	GEN, KAN, SUL, SXT, TMP, TET	CTX-M-14a	-	1	88 H <sup>i</sup>
EIC0321A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	2	104/63 K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC0491A	CTX-M-14a + TEM	CIP, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	3	372/91/54 -/K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC0511A	CTX-M-14a	CM, KAN, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	1	105 K <sup>i</sup>
EIC0541A	CTX-M-14a + TEM	SUL, TET	CTX-M-14a	-	2	106/62 K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC0691A	CTX-M-14a	CIP, NAL, TET	CTX-M-14a	-	2	109/62 K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC1211A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	2	71/42 K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC1251A	CTX-M-14a	CM, SUL	CTX-M-14a	-	2	71/39 K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC0061A	CTX-M-14b	CM, CIP, FZD, NAL, SUL, SXT, TET, TMP				
EIC0161A	CTX-M-9	SUL	CTX-M-9	-	2	303/51 H12/N <sup>j</sup>
EIC0931A <sup>a</sup>	CTX-M-9 + TEM	FZD, KAN, NAL, SUL, SXT, TMP				
EIC0081A <sup>b</sup>	CTX-M-1 + TEM	FZD, TET	CTX-M-1	-	1	54 N <sup>j</sup>
EIC0521A	CTX-M-32 + TEM	TET	CTX-M-32	-	1	54 N <sup>j</sup>
EIC0551A	CTX-M-15 + TEM	CIP, NAL, SUL, SXT, TET, TMP				
EIC0481A	SHV-2 + TEM	CIP, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	SHV-2	-	3	363/181/42 -/K <sup>i</sup> / <sub>-</sub>
EIC0091A	SHV-12 + TEM	CM, CIP, GEN, NAL, SUL, TET, SXT, TMP	SHV-12	-	1	64 N <sup>j</sup>
EIC0231A	SHV-12	CIP, FZD, KAN, NAL, TET	SHV-12	-	1	39 N <sup>j</sup>

Tabla 3.12. (Continuación)

Cepa	Enzima	Cepa donadora					Cepa transconjugante		
		Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>f</sup>	Número	Tamaño (Kb)	Grupo Inc
Hospital Vall d'Hebron									
E4C0031A	CTX-M-14a	STR, CIP, NAL, SUL, SXT, TMP, TET	CTX-M-14a	-	-	2	96/52	<sup>h</sup>	
E4C0041A <sup>e</sup>	CTX-M-14a	GEN, NAL, SUL, STR, SXT, TMP	CTX-M-14a	SUL, SXT, TMP	-	2	113/35	-	
E4C0042A	CTX-M-14a	KAN, SUL, STR, SXT, TMP	CTX-M-14a	KAN, SUL, SXT, TMP	-	1	130	-	
E4C0061A	CTX-M-14a	GEN, CIP, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP							
E4C0201A	CTX-M-14a	SUL, STR, SXT, TMP							
E4C0281A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	-	2	104/52	K <sup>i</sup> -	
E4C0381A	CTX-M-14a	CM, GEN, KAN, SUL, SXT, TET, TMP, TOB							
E4C0431A	CTX-M-14a	SUL, STR, TET	CTX-M-14a	-	-	2	106/54	K <sup>i</sup> -	
E4C0461A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	-	2	105/55	K <sup>i</sup> -	
E4C0501A	CTX-M-14a	CM, CIP, NAL, SUL, STR, TET	CTX-M-14a	-	-	2	106/56	K <sup>i</sup> -	
E4C0551A	CTX-M-14a	CIP, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	-	2	105/54	K <sup>i</sup> -	
E4C0651A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	-	2	104/52	K <sup>i</sup> -	
E4C0791A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	TET	-	2	118/75	-/L-M <sup>f</sup>	
E4C0021A	CTX-M-14b	KAN, CM, CIP, NAL, SUL, STR, SXT, TMP, TET							
E4C0111A	CTX-M-9	CM, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	SUL, SXT, TMP	-	2	178/59	-	
E4C0261A <sup>d</sup>	CTX-M-9	CM, KAN, NAL, NT, STR, SUL, SXT, TET, TMP, TOB							
E4C0271A <sup>e</sup>	CTX-M-9	CM, KAN, NAL, SUL, SXT, TMP, TET, TOB	CTX-M-9	TET	-	1	146	N <sup>j</sup>	
E4C0451A <sup>a</sup>	CTX-M-9	KAN, NAL, NT, SUL, STR, SXT, TMP							
E4C0571A	SHV-12	TET	SHV-12	-	-	1	87	-	
E4C0681A	SHV-12	NAL, NT, STR							

<sup>a</sup> *S. enterica*. <sup>b</sup> *P. mirabilis*. <sup>c</sup> *K. oxytoca*. <sup>d</sup> *E. cloacae*. <sup>e</sup> *K. pneumoniae*. <sup>f</sup> Las abreviaturas de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se especifican en el pie de la Tabla 3.10. <sup>g</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE se señalan en negrita. <sup>h</sup> - No identificado. <sup>i</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>j</sup> Grupo Inc identificado por *Southern*. Se señala en sombreado las cepas que no conjugaron.

**Tabla 3.13.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE y CMY-2 procedentes de cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales.

Cepa	Cepa donadora			Cepa transconjugante		
	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Plásmido <sup>b</sup>	Grupo Inc
					Número	Tamaño (Kb)
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau						
S1C0201A	CTX-M-14a	TET				
S1C0211A	CTX-M-14a	NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2	94/47
S1C0522A	CTX-M-14a	KAN, SUL, STR, TMP, SXT				
S1C0671A	CTX-M-14a	CM, CIP, GEN, NAL, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CTX-M-14a	-	2	71/40
S1C0192A	CTX-M-14b	NAL, SUL, SXT, TMP				
S1C0323A	CTX-M-9	CM, CIP, KAN, NAL, STR, SUL, SXT, TET, TMP				
S1C0401A	CTX-M-9	SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	SSS, SXT, TMP	2	133/57
S1C0261A	CTX-M-10	CM, SUL, STR, SXT, TMP, TET	CTX-M-10	SSS, SXT, TMP	3	356/77/49
S1C0251A	CTX-M-14a + SHV-12	CM, STR, SUL, TET	SHV-12	-	1	98
S1C0272A	SHV-12	TET	SHV-12	TET	3	120/80/23
S1C0471A	CMY-2	CM, CIP, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, TET, TMP, TOB	CMY-2	CM, SSS, TET	1	224
S1C0681A	CMY-2	CM, GEN, KAN, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CMY-2	SSS, SXT, TET, TMP	1	374
Hospital Vall d'Hebron						
S4C0111A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	2	39/72
S4C0021A	CTX-M-15	-	CTX-M-15	-	2	108/57
S4C0171A	CTX-M-14b	CM, CIP, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP				
S4C0191A	CTX-M-9	SUL				

<sup>a</sup> Las abreviaturas de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se especifican en el pie de la Tabla 3.10. <sup>b</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE o CMY-2 se señalan en negrita. <sup>c</sup> - No identificado. <sup>d</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>e</sup> Grupo Inc identificado por *Southern*. Se señala en sombreado las cepas que no conjugaron

**Tabla 3.14.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE procedentes de cepas de *E. coli* aisladas de brotes alimentarios.

Cepa donadora		Cepa transconjugante			
Cepa	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Plásmido <sup>b</sup>
				Número	Tamaño (Kb) Número
B4C0101A	CTX-M-14a	TET	CTX-M-14a	-	2 100/55
B4C0221A	CTX-M-14a	CIP, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP			
B4C0301A	CTX-M-14a	NT, SUL, STR, TET	CTX-M-14a	-	2 102/51
B4C0351A	CTX-M-14a	SUL, STR	CTX-M-14a	-	2 78/44
B4C0371A	CTX-M-14a	NAL, SUL, STR, TET	CTX-M-14a	-	2 101/49
B4C0531A	CTX-M-14a	CM, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2 76/45
B4C0601A	CTX-M-14a	SUL	CTX-M-14a	-	2 78/46
B4C0021A	CTX-M-14b	CM, KAN, SUL, STR, SXT, TET, TMP			
B4C0661A	CTX-M-14b	CM, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-14b	CM, SUL, SXT, TET, TMP	2 310/59
B4C0051A	CTX-M-9	SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	-	2 350/53
B4C0321A	CTX-M-9	NAL, SUL, SXT, TET, TMP			
B4C0551A	CTX-M-32	SUL, STR	CTX-M-32	-	1 48
B4C0631A	SHV-12	CM, CIP, FZD, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	SHV-12	-	3 226/124/54
B4C0291A	TEM-52	NAL, NT, SUL, STR, SXT, TET, TMP	TEM-52	-	1 45

<sup>a</sup> Las abreviaturas de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se especifican en el pie de la Tabla 3.10. <sup>b</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE se señalan en negrita. <sup>c</sup> - No identificado. <sup>d</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>e</sup> Grupo Inc identificado por *Southern*. Se señala en sombreado las cepas que no conjugaron.

**Tabla 3.15.** Características más relevantes de los plásmidos portadores de BLEE procedentes de cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales.

Cepa	Cepa donadora			Cepa transconjugante			
	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Enzima	Resistencia a antibióticos no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup>	Número	Tamaño (Kb)	Plásmido <sup>b</sup>
H3C0013A	CTX-M-14a	SUL, SXT, TET	CTX-M-14a	-	2	102/50	- <sup>c</sup>
H3C0015A	CTX-M-14a	NAL, TMP, SXT, TET	CTX-M-14a	-	2	109/58	K <sup>d/-</sup>
H3C0021B	CTX-M-14a	KAN, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-14a	-	2	114/46	-
H3C0044A	CTX-M-14a	SUL, TET	CTX-M-14a	SUL, TET	2	98/52	FII <sup>d</sup> y K <sup>d</sup> /FII <sup>d</sup>
H3C0048A	CTX-M-14a	CIP, GEN, KAN, NAL, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CTX-M-14a	-	2	171/99	-
H3C0011A	CTX-M-9	SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	SUL, SXT, TET, TMP	2	109/46	P <sup>e/-</sup>
H3C0017A	CTX-M-9 + TEM	SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	SUL, SXT, TET, TMP	1	468	HI2 <sup>e</sup>
H3C0037A	CTX-M-9	SUL, SXT, TMP					
H3C0037B	CTX-M-9	SUL, SXT, TMP					
H3C0041A	CTX-M-9 + TEM	CIP, NAL, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	SUL, SXT, TET, TMP	2	128/58	-
H3C0056A	CTX-M-9	NAL, SUL, SXT, TET, TMP					
H3C0014A	CTX-M-32	NAL, SUL, TET					
H3C0041B	CTX-M-51	SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-51	SUL, SXT, TET, TMP	3	514/413/43	-/FII <sup>e</sup> y HI2 <sup>e</sup> /FII <sup>d</sup>
H3C0042A	SHV-12	CM, CIP, KAN, NAL, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	SHV-12	-	2	83/38	-
H3C0043A	SHV-12	NAL, SXT, TET, TMP	SHV-12	-	2	84/36	-/N <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Las abreviaturas de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se especifican en el pie de la Tabla 3.10. <sup>b</sup> El tamaño y el grupo Inc de los plásmidos portadores de BLEE se señalan en negrita. <sup>c</sup> - No identificado. <sup>d</sup> Grupo Inc identificado por secuenciación. <sup>e</sup> Grupo Inc identificado por *Southern*. Se señala en sombreado las cepas que no conjugaron.

#### ***4. CONCLUSIONES***

---

## 4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que pueden extraerse a partir de los datos obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

1. Los estudios realizados en cepas procedentes de granjas de animales muestran que existe una alta prevalencia de las enzimas CTX-M-14 y CTX-M-1 en granjas de aves y de cerdos, respectivamente.
2. Se describen por primera vez las enzimas TEM-52 y SHV-2 en granjas de aves, las CTX-M-1 y SHV-5 en granjas de cerdos y la cefamicinasa CMY-2 en granjas de conejos.
3. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las granjas de animales son un reservorio de genes de BLEE y CMY-2. Además, sugieren que el tratamiento de los animales con  $\beta$ -lactámicos podría ser una de las primeras causas de la prevalencia de estas resistencias, las cuales pueden también coseleccionarse por el uso de antibióticos no  $\beta$ -lactámicos.
4. La mayoría de las cepas de *E. coli*, portadoras de  $\beta$ -lactamasas, aisladas de granjas de animales derivan de los grupos filogenéticos A y B1. No obstante, un 32% de todas las cepas pertenecen a los filogrupos B2 o D, lo cual pone de manifiesto la posible presencia de cepas patógenas en granjas de animales.
5. Un 9,4% de las cepas de *E. coli* aisladas de granjas de animales son ExPEC, la mayoría de las cuales derivan del filogrupo D y portan la enzima CMY-2. No se han observado diferencias significativas entre el estatus ExPEC/no ExPEC con respecto a la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas.
6. Con independencia del origen de las cepas, la mayoría de BLEE y CMY-2 se hallan codificadas en plásmidos transferibles por conjugación, lo cual explica la creciente difusión de este tipo de resistencias.

7. La metodología desarrollada en este trabajo permite realizar de forma rápida una identificación de los grupos de incompatibilidad plasmídicos más comunes de enterobacterias.
8. Las enzimas CTX-M-9 y SHV-12 se encuentran codificadas en plásmidos que pertenecen a grupos Inc muy diversos.
9. La enzima CTX-M-14a ha sido identificada en todos los ambientes estudiados, estando codificada mayoritariamente en plásmidos conjugativos del grupo IncK.
10. Todos los plásmidos del grupo IncHI2 estudiados en este trabajo codifican enzimas CTX-M-14b o bien CTX-M-9, lo cual corrobora la hipótesis sobre el origen del gen *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> a partir del gen *bla*<sub>CTX-M-9</sub>.
11. Los plásmidos conjugativos portadores de enzimas del grupo CTX-M-1, a excepción de uno de ellos, pertenecen al grupo IncN y tienen pesos moleculares muy similares.
12. La única cefamicinasa encontrada en este estudio, la CMY-2, está presente en plásmidos, generalmente de alto peso molecular, que siempre contienen los replicones IncQ e IncA/C<sub>2</sub>.
13. Para las enzimas CTX-M-14a, las de la familia CTX-M-1 y la cefamicinasa CMY-2 se ha encontrado que existe un alto grado de correlación entre la enzima y el grupo de incompatibilidad del plásmido que la codifica. Esta relación es independiente del tipo de ambiente de donde proceden los plásmidos, lo cual apunta a que probablemente hubo una diseminación de un plásmido inicial desde un ambiente determinado junto con una posterior evolución plasmídica.

## ***5. BIBLIOGRAFÍA***

---

## 5. BIBLIOGRAFÍA

**Aarestrup, F. M., Hasman, H., Olsen, I. y Sorensen, G.** (2004) International spread of *bla*<sub>CMY-2</sub>-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Ant. Agents Chemother.* 48, 1916-1917.

**Ábeles, A. L., Snyder, K. M. y Chattoraj, D. K.** (1984) P1 Plasmid Replication: Replicon Structure. 173, 307-324.

**Abraham, E. P. y Chain, E.** (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837.

**Ambler, R. P.** (1980) The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 289:321-331.

**Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A. y Centron, D.** (2002) *bla*<sub>CTX-M-2</sub> is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Ant. Agents Chemother.* 46:2303-2306.

**Athanasopoulos, V., Praszker, J. y Pittard, A. J.** (1995) The replication of an IncL/M plasmid is subject to antisense control. *J. Bacteriol.* 16:4730-4741.

**Bandoh, K., Watanabe, K., Muto, Y., Tanaka, Y., Kato, N. y Ueno, K.** (1992) Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot.* 45:542-547.

**Barlow, M. y Hall, B. G.** (2002) Phylogenetic analysis shows that the OXA  $\beta$ -lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J. Mol. Evol.* 55:314-321.

**Barnes, J. H., Vaillancourt, J. y Gross, W. B.** (2003) Colibacillosis. pág. 631-652. En: *Diseases of poultry*. Eds: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M. y McDougald, L. R. Undécima Edición. Iowa State University Press, Ames, IA.

**Batchelor, F. R., Doyle, P. D., Nayler, J. H. C. y Rolinson G. N.** (1959) Synthesis of penicillin: 6-amino-penicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* 183: 257-258.

**Birnboim, H. C. y Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.

**Blanc, V., Mesa, R., Saco, M., Lavilla, S., Prats, G., Miró, E., Navarro, F., Cortés P. y Llagostera, M.** (2006) ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet. Microbiol.* 118:299-304.

**Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A. y Blanco, J.** (1997) Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated form septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 11:2953-2957.

**Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Garabal, J. I. y González, E. A.** (1992) Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 155-159.

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

**Bou, G., Cartelle, M., Tomas, M., Canle, D., Molina, F., Moure, R., Eiros, J. M. y Guerrero, A.** (2002) Identification and broad dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40:4030-4036.

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

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

**Brantl, S.** (1994) The *copR* gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential *repR* promoter. *Mol. Microbiol.* 14:473-483.

**Brantl, S.** (2004) Plasmid replication control by antisense RNAs. pág. 47-62. En: *Plasmid Biology*. Eds. Funnell, B. E. y Phillips, G. J. ASM Press, Washington, D. C.

**Brantl, S. y Wagner, E. G. H.** (1997) Dual function of the *copR* gene product of plasmid pIP501. *J. Bacteriol.* 179:7016-7024.

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

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

**Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C. y Rolinson, C. N.** (1976) Naturally occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29:668-669.

**Bush, K.** (1989a) Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Ant. Agents Chemother.* 33:259-263.

**Bush, K.** (1989b) Classification of  $\beta$ -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Ant. Agents Chemother.* 33:264-270.

**Bush, K., Jacoby, G. A. y Medeiros, A. A.** (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Ant. Agents Chemother.* 39:1211-1233.

**Cantón, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varela, M. C., Pérez-Díaz, J. C. y Baquero, F.** (2002) Epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J. Clin. Microbiol.* 40:1237-1243.

**Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. y Threlfall, E. J.** (2005b) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63:219-228.

**Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P. y Battisti, A.** (2005a) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Ant. Agents Chemother.* 49:833-835.

**Carattoli, A., Miriagou, V., Bertini, A., Loli, A., Colinon, C., Villa, L., Whichard, J. M. y Rossolini, J. M.** (2006) Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer  $\beta$ -lactams. *Emerg. Infect. Dis.* 12:1145-1148.

**Cárdenas, M., Fernández de Henestrosa, A. R., Campoy, S., Pérez de Rozas, A. M., Barbé, J., Badiola, I. y Llagostera, M.** (2001) Virulence of *Pasteurella multocida recA* mutants. *Vet. Microbiol.* 80:53-61.

**Cartelle, M., Tomas, M. M., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R. y Bou, G.** (2004) High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Ant. Agents Chemother.* 48:2308-2313.

**Chaslus-Dancla, E., Pohl, P., Meurisse, M., Marin, M. y Lafont, J. P.** (1991) High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. *Ant. Agents Chemother.* 35:590-593.

**Chouikha, I., Germon, P., Brée, A., Gilot, P., Moulin-Schouleur, M. y Schouler, C.** (2006) A *selC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. J. Bacteriol. 188:977-987.

**Chu, G., Vollrath, D. y Davis, R. W.** (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234:1582-1585.

**Clark, A. J. y Maaløe, O.** (1967) DNA replication and the division cycle of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 23, 99-112.

**Clermont, O., Bonacorsi, S. y Bingen, E.** (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. App. Env. Microbiol. 66:4555-4558.

**Clinical and Laboratory Standards Institute** (2005) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests-eighth informational supplement: Approved standard M2-A8. CLSI, Wayne, PA, USA.

**Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. y Maas, W. K.** (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. Microb. Rev. 52:375-395.

**Datta, N.** (1975) Epidemiology and classification of plasmids. pág. 9-15. En: Microbiology. Ed: Schlessinger, D. ASM Press, Washington, D. C.

**Datta, N. y Hedges, R. W.** (1972) R factors identified in Paris, some conferring gentamycin resistance, constitute a new compatibility group. Ann. Inst. Pasteur 123:849-852.

**Datta, N. y Kontomichalou, P.** (1965) Penicillinase sintesis controlles by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature 208:239-241.

**Davis, M. A., Marin, K. A. y Austin, S. J.** (1992) Biochemical activities for the ParA partition protein of the P1 plasmid. Mol. Microbiol. 6:1141-1147.

**del Solar G., Giraldo, R., Ruíz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. y Díaz-Orejas, R.** (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 21:661-666.

**Delicato, E. R., Guimarães de Brito, B., Caziri, L. C. J. y Vidotto, M. C.** (2003) Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103.

**Demain, A. L. y Elander, R. P.** (1999) The  $\beta$ -lactam antibiotics: past, present, and future. *Ant. Van Leeuw.* 75:5-19.

**Dias da Silveira, W., Ferreira, A., Brocchi, M., Hollanda, L. M., Pestana de Castro, A. F., Yamada, A. T. y Lancellotti, M.** (2002) Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 85:47-53.

**Doran, K. S., Helinski, D. R. y Konieczny, I.** (1999) A critical DnaA box directs the cooperative binding of the *Escherichia coli* DnaA protein to the plasmid RK2 replication origin. *J. Biol. Chem.* 274:17918-17923.

**Dower, W. J., Miller, F. y Ragsdale, C. W.** (1988) High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145.

**Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. y Curtiss III, R.** (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect. Immun.* 68:4145-4154.

**Dubnau, E. y Maas, W. K.** (1968) Inhibition of replication of an F'lac episome in Hfr cells of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 95:531-539.

**Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H-C. y Wieler, L. H.** (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104:91-101.

- Farmer III, J. J.** (2003) *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. pág. 636-652. En: Manual of Clinical Microbiology. Eds. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, F. C. y Tenover, R. H. Octava edición. vol. 1. ASM Press, Washington, D. C.
- Feinberg, A. P. y Volgelstein, B.** (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Filutowicz, M., McEachern, M. J. y Helinski, D. R.** (1986) Positive and negative roles of an initiator protein at an origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9645-9649.
- Fried, J. S. y Hinthorn, D. R.** (1985) The Cephalosporin. *Dis. Mon.* 31:1-60.
- Friedman, S. A. y Austin, S. J.** (1988) The P1 plasmid-partition system synthesizes two essential proteins from an autoregulated operon. *Plasmid* 19:103-112.
- Funnell, B. E.** (1991) The P1 partition complex at *parS*: the influence of *Escherichia coli* integration host factor and of substrate topology. *J. Biol. Chem.* 266:14328-14337.
- Funnell, B. E. y Slavcev, R. A.** (2004) Partition systems of bacterial plasmids. pág. 81-103. En: Plasmid Biology. Eds. Funnell, B. E. y Phillips, G. J. ASM Press, Washington, D. C.
- Garau, J., Xercavins, M., Rodríguez-Carballeira, M., Gómez-Vera, J. R., Coll, I., Vidal, D., Llovet, T. y Ruíz-Bremón, A.** (1999) Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Ant. Agents Chemother.* 43: 2736-2741.
- García, A., Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., Campoy, S. y Coll, P.** (2005) Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J. Ant. Chemother.* 56: 819-826.
- García, A., Navarro, F., Miró, E., Villa, L., Mirelis, B., Coll, P. y Carattoli, A.** (2007) Acquisition and diffusion of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene by R478-IncHI2 derivative plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:71-77.

**Gerdes, K., Moller-Jensen, J. y Jensen, R. B.** (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* 37:455-466.

**Gilmour, M. W., Thomson, N. R., Sanders, M., Parkhill, J. y Taylor, D. E.** (2004) The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* 52:182-202.

**Gilson, L., Mahanty, H. K. y Kolter, R.** (1987) Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* 169:2466-2470.

**Girlich, D., Poirel, L., Carattoli, A., Kempf, I., Lartigue, M-F., Bertini, A. y Nordmann, P.** (2007) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Appl. Environm. Microbiol.* 73:4681-4685.

**Götz, A., Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschäpe, H., van Elsas, J. D. y Smalla, K.** (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 62:2621-2628.

**Grant, A. J. y Pittard, J.** (1974) Incompatibility reactions of R plasmids isolated from *Escherichia coli* of animal origin. *J. Bacteriol.* 120:185-190.

**Gstalter, M. E., Faelen, M., Mine, N., Top, E. M., Mergeay, M. y Couturier, M.** (2003) Replication functions of new broad host range plasmids isolated from polluted soils. *Res. Microbiol.* 154:499-509.

**Guardabassi, L. y Courvalin, C.** (2006) Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. pág. 1-18. En: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* Ed: Aarestrup, F. ASM Press, Washington, D. C.

**Hacker, J. y Kaper, J. B.** (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:641-679.

**Haines, A. S., Cheung, M. y Thomas, C. M.** (2006) Evidence that IncG (IncP-6) and IncU plasmids form a single incompatibility group. *Plasmid* 55:210-215.

**Hale, T. L. y Keusch, G. T.** (1996) *Shigella*. En: Medical Microbiology. Eds: Baron, S., Peake, R. C., James, D. A., Susman, M., Kennedy, C. A., Durson Singleton, M. J. y Schuenke, S. Cuarta edición. Universidad de Texas. Galveston, Texas.

**Hall, B. H. y Barlow, M.** (2004) Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Res. Updates*. 7:111-123.

**Hara-Kudo, Y., Morishita, Y., Nagaoka, Y., Kasuga, F. y Kumagai, S.** (1996) Incidence of diarrhea with antibiotics and the increase of clostridia in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.* 58:1181-1185.

**Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I. y Aarestrup, F. M.** (2005)  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Ant. Chemother.* 56, 115-121.

**Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. y Whittam, T. S.** (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6175-6181.

**Ho, T. Q., Zhong, Z., Aung, S. y Pogliano, J.** (2002) Compatible bacterial plasmids are targeted to independent cellular locations in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 21:1864-1872.

**Hopkins, K. L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E. J. y Carattoli, A.** (2006) Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY  $\beta$ -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Ant. Agents Chemother.* 50:3203-3206.

**Horcajada, J. P., Soto, S., Gajewski, A., Smithson, A., Jiménez de Anta, M. T., Mensa, J., Vila, J. y Johnson, J. R.** (2005) Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. *J. Clin. Microbiol.* 43:2962-2964.

**Horii, T., Arakawa, Y., Ohta, M., Sugiyama, T., Wacharotayankun, R., Ito, H. y Kato, N.** (1994) Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed *bla*<sub>MOX-1</sub> gene encoding ampC-type  $\beta$ -lactamase. *Gene* 139:93-98.

**Horne, S. M., Pfaff-McDonough, S. J., Giddings, C. W. y Nolan, L. K.** (2000) Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Av. Dis.* 44:179-184.

**Huijbregts, R. P. H., de Kroon, A. I. P. M. y de Kruijff, B.** (2000) Topology and transport of membrana lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1469:43-61.

**Huletsky, A., Knox, J. R. y Levesque, R. C.** (1993) Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of 3rd-generation cephalosporins by SHV-type  $\beta$ -lactamases probed by site-directed mutagenesis and 3-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* 268:3690-3697.

**Ingmer, H., Fong, E. L. y Cohen, S. N.** (1995) Monomer-dimer equilibrium of the pSC101 RepA protein. *J. Mol. Biol.* 250:309-314.

**Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N. y Ohta, M.** (1995) Plasmid-mediated dissemination of the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Ant. Agents Chemother.* 39:824-829.

**Jacoby, G. A.** (2006)  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Ant. Agents Chemother.* 50:1123-1129.

**Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C. y Wieler, L. H.** (2001) Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:371-378.

**Jensen, R. B. y Gerdes, K.** (1999) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicons during the cell cycle. *EMBO J.* 18:4076-4084.

**Jensen, R. B., Lurz, R. y Gerdes, K.** (1998) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by *parC* of plasmid R1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:8550-8555.

**Johnson, J. R. y Stell, A. L.** (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J. Infect. Dis. 181:261-272.

**Johnson, J. R. y Russo, T. A.** (2002) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. J. Lab. Clin. Med. 139:155-162.

**Johnson, J. R., Delavarri, P., Kuskowski, M. y Stell, A. L.** (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 183:78-88.

**Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. y Garau, J.** (2006a) Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. J. Infect. Dis. 194:71-78.

**Johnson, J. R., Kuskowski, M., Denamur, E., Elion, J. y Picard, B.** (2000) Clonal origin, virulence factors, and virulence [letter and reply]. Infect. Immun. 68:424-425.

**Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A. y Winokur, P.L.** (2003b). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. J. Infect. Dis. 188, 759-768.

**Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A. y Smith, K. E.** (2003a) Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. Ant. Agents Chemother. 47:2161-2168.

**Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J. y Nolan, L.** (2005) DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Ant. Agents Chemother.* 49:4681-4688.

**Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J. y Nolan, L.** (2006b) DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188:745-758.

**Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Miller, T. W., Miller, A. K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H. B. y Birnbaum, J.** (1979) Thienamycin, a new  $\beta$ -lactam antibiotic. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J. Antibiot.* 32:1-12.

**Kaper, J. B.** (2005) Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Medical Microbiol.* 295:355-356.

**Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L.** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.

**Kariyawasam, S., Johnson, T. J. y Nolan, L. K.** (2006) The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* Strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect. Immun.* 74: 744-749.

**Kim, S. K. y Wang, J. C.** (1998) Localization of F plasmid SopB protein to positions near the poles of *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1523-1527.

**Klein, N. C. y Cunha, B. A.** (1995) Third-generation cephalosporins. *Med. Clin. North. Am.* 79:693-707.

**Kolter, R. y Helinsky, D. R.** (1982) Plasmid R6K DNA replication. Direct nucleotide sequence repeats are required for an active  $\gamma$ -origin. *J. Mol. Biol.* 161:45-56.

**Krüger, R., Rakowski, S. A. y Filutowicz, M.** (2004) Participating elements in the replication of iteron-containing plasmids. pág. 25-45. En: *Plasmid Biology*. Eds: Funnell, B. E. y Phillips, G. J. ASM Press. Washington, D. C.

**Lacatena, R. M. y Cesareni, G.** (1983) Interaction between RNAI and the primer precursor in the regulation of ColE1 replication. *J. Mol. Biol.* 170:635-650.

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

**Le Bougu nec, C.** (2005) Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295:471-478.

**Liebana, E., Batchelor, M., Hopkins, K. L., Clifton-Hadley, F. A., Teale, C. J., Foster, A., Barker, L., Threlfall, E. J. y Davies, R. H.** (2006) Longitudinal farm study of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J. Clin. Microbiol.* 44:1630-1634.

**Liebana, E., Clouting, C., Cassar, C. A., Randall, L. P., Walker, R. A., Threlfall, E. J., Clifton-Hadley, F. A., Ridley, A. M. y Davies, R. H.** (2002) Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1481-1486.

**Liebana, E., Gibbs, M., Clouting, C., Barker, L., Clifton-Hadley, F. A., Pleydell, E., Abdalhamid, B., Hanson, N. D., Martin, L., Poppe, C. y Davies, R. H.** (2004) Characterization of  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb. Drug Resist.* 10:1-9.

**Liu, J-H., Wei, S-Y., Ma, J-Y., Zeng, Z-L., L , D-H., Yang, G-X. y Chen, Z-L.** (2007) Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong province of China. *Int. J. Ant. Agents* 29:576-581.

**Livermore, D. M.** (1995)  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microb. Rev.* 8:557-584.

**Livermore, D. M.** (1998)  $\beta$ -Lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J. Ant. Chemother.* 41:25-41.

**Llanes, C., Gabant, P., Couturier, M. y Michel-Briand, Y.** (1994). Cloning and characterization of the IncA/C plasmid RA1 replicon. *J. Bacteriol.* 176:3403-3407.

**Maas, R. y Maas, W. K.** (1962) Introduction of a gene from *Escherichia coli* B into Hfr and F<sup>-</sup> strains of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1887-1893.

**Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J.** (2003) Brock. Biology of Microorganisms. Ed. Pearson. Prentice Hall.

**Marín, M. y Gudiol, F.** (2002) Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:42-55.

**Marshall, W. F. y Blair, J. E.** (1999) The cephalosporins. *Mayo clinic Proc.* 79:187-95.

**Masai, H. y Arai, K.** (1988) R1 plasmid replication *in vitro*. RepA and dnaA-dependent initiation at oriR. pág. 113-121. En: DNA Replication and Mutagenesis. Eds: Moses, R. E. y Summers, K. C. ASM Press, Washinton D. C.

**Maurer, J. J., Brown, T. P., Steffens, W. L. y Thayer, S. G.** (1998) The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Av. Dis.* 42:106-118.

**McEachern, M. J., Filutowicz, M. y Helinski, D. R.** (1989) Negative control of plasmid R6K replication: possible role of intermolecular coupling of replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7942-7946.

**McEachern, M. J., Filutowicz, M. y Helinski, D. R.** (1985) Mutations in direct repeat sequences and in conserved sequence adjacent to the repeats result in a defective replication origin in plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1480-1484.

**McPeake, S. J. W., Smyth, J. A. y Ball., H. J.** (2005) Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* 110:245-253.

**Medeiros, A. A.** (1997) Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* 24:S19-45.

**Mella, S. M., Zemelman, C. M., Bello, H. T., Domínguez, M. Y., González, G. R. y Zemelman, R. Z.** (2001) Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura-actividad de cefalosporinas e importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev. Clin. Infect.* 18:7-19.

**Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss III, R., Lehoux, B. y Fairbrother, J. M.** (2003) Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect. Immun.* 71:494-503.

**Mesa, R. J.** (2007) Tesis doctoral: Estudi de les  $\beta$ -lactamasas plasmídiques d'espectre ampliat, cefamicinases i carbapenemases en diferents ecosistemes. Anàlisi del seu entorn genètic. Universitat Autònoma de Barcelona.

**Meyer, R. J., Lin, L. S., Kim, K. y Brasch, M. A.** (1985) Broad host-range plasmid R1162: replication, incompatibility and copy-number control. pág. 173-188. En: *Plasmids in bacteria*. Eds: Helinski, D. R., Cohen, S. N., Clewell, D. B., Jackson, D. A. y Hollaender, A. Plenum publishing Corp., New York.

**Miller, J. M.** (1992) *A short course in bacterial genetics. Handbook.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Mirelis, B., Rivera, A., Miró, E., Mesa, R. J., Navarro, F. y Coll, P.** (2006) A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24:370-372.

**Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Rivera, A., Mesa, R. J., Roig, M. C., Gómez, L. y Coll, P.** (2005). Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J. Ant. Chemother.* 56:1152-1155.

**Mokady, D., Gophna, U. y Ron, E. Z.** (2005) Virulence factors of septicemia *Escherichia coli* strains. *Int. J. Microbiol.* 295:455-462.

**Moreno, E., Prats, G., Sabaté, M., Pérez, T., Johnson, R. J. y Andreu, A.** (2006) Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Ant. Chemother.* 57, 204-211.

**Mori, H., Kondo, A., Ohshima, A., Ogura, T. y Hiraga, S.** (1986) Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* 192:1-15.

**Muesing, M., Tamm, J., Shepard, M. H. y Polisky, B.** (1981) A single base-pair alteration is responsible for the DNA overproduction phenotype of a plasmid-copy-number mutant. *Cell* 24:235-242.

**Murotzu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H. y Takanami, M.** (1981) Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. *Gene* 15: 257-271.

**Nataro, J. P. y Kaper, J. B.** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.

**Navarro, F., Mesa, R. J., Miró, E., Gómez, L., Mirelis, B. y Coll, P.** (2007) Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol. Lett.* 273:120-123.

**Neilands, J. B.** (1995) Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270:26723-26726.

**Newton, G. G. F. y Abraham, E. P.** (1955) Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulfur and D- $\alpha$ -aminoadipic acid. *Nature* 175:548.

**Nordström, K.** (1990) Control of plasmid replication. How do DNA iterons set the replication frequency? *Cell* 63:1121-1124.

**Novais, Â., Cantón, R., Moreira, R., Peixe, L., Baquero, F. y Coque, T. M.** (2007) Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Ant. Agents Chemother.* 51:796-799.

**Novais, Â., Cantón, R., Valverde, A., Machado, E., Galán, J. C., Peixe, L., Carattoli, A., Baquero, F. y Coque, T. M.** (2006) Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1- $\alpha$ , and IncFI groups. *Ant. Agents Chemother.* 50:2741-2750.

**Novick, R. P.** (1987) Plasmid Incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51:381-395.

**Novick, R. P., Iordanescu, S., Projan, S. J., Kornblum, J. y Edelman, I.** (1989) pT181 plasmid replication is regulated by a countertranscript-driven transcriptional attenuator. *Cell* 59:395-404.

**Ochman, H. y Selander, R. K.** (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157:690-692.

**Okumura, M. S. y Kado, C. I.** (1992) The region essential for efficient autonomous replication of pSa in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 235:55-63.

**Ortega-Jiménez, S., Giraldo-Suárez, R., Fernández-Tresguerres, M. E., Berzal-Herranz, A. y Díaz-Orejas, R.** (1992) DnaA dependent replication of plasmid R1 occurs in the presence of point mutations that disrupt the dnaA box of oriR. *Nucleic Acids Res.* 20:2547-2551.

**Osborn, A. M., Pickup, R. W. y Saunders, J. R.** (2000) Development and application of molecular tools in the study of IncN-related plasmids from lakewater sediments. *FEMS Microbiol. Letters* 186:203-208.

**Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A. y Jacoby, G. A.** (1990) Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and  $\alpha$ -methoxy  $\beta$ -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ant. Agents Chemother.* 34:2200-2209.

**Parreira, V. R. y Gyles, C. L.** (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* 71:5087-5096.

**Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. J. y Knowles, D. J. C.** (1994) Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important  $\beta$ -lactamases. *Ant. Agents Chemother.* 38:767-772.

**Pfaff-McDonough, S. J., Horne, S. M., Giddings, C. W., Ebert, J. O., Doetkott, C., Smith, M. H. y Nolan, L. K.** (2000) Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Av. Dis.* 44:23-33.

**Philippon, A., Arlet, B. y Jacoby, G. A.** (2002) Plasmid-mediated AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Ant. Agents Chemother.* 46:1-11.

**Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. y Denamur, E.** (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 67:546-553.

**Pogliano, J., Ho, T. Q., Zhong, Z. P. y Helinski, D. R.** (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:4486-4491.

**Pohl, P., Glupczynski, Y., Marin, M., van Robaeys, G., Lintermans, P. y Couturier, M.** (1993) Replicon typing characterization of plasmids encoding resistance to gentamicin

and apramycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* isolated from human and animal sources in Belgium. *Epidemiol. Infect.* 111:229-238.

**Poirel, L., Kampfer, P. y Nordmann, P.** (2002) Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Ant. Agents Chemother.* 46:4038-4040.

**Reingold, J., Starr, N., Maurer, J. y Lee, M. D.** (1999) Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet. Microbiol.* 66:125-134.

**Rhodes, G., Parkhill, J., Bird, C., Ambrose, K., Jones, M. C., Huys, G. y Swings, J.** (2004) Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl. Environm. Microbiol.* 70:7497-7510.

**Richmond, M. H. y Sykes, R. B.** (1973) The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* 9:31-88.

**Rodríguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K. y Nolan, L. K.** (2005) Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* 151:2097-2110.

**Ron, E. Z.** (2006) Host specificity of septicemia *Escherichia coli*: human and avian pathogens. *Curr. Op. Microbiol.* 9:28-32.

**Rupp, M. E. y Fey, P. D.** (2003) Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. Considerations for diagnosis, preventions and drug treatment. *Drugs* 63:353-365.

**Russo, T. A. y Johnson, J. R.** (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181:1753-1754.

**Ryder, T. B., Davison, D. B., Rosen, J. I., Ohtsubo, E. y Ohtsubo, H.** (1982) Analysis of plasmid genome evolution based on nucleotide-sequence comparison of two related plasmids of *Escherichia coli*. *Gene*: 17:299-310.

**Saadi, S., Maas, W. K., Hill, D. F. y Bergquist, P. L.** (1987) Nucleotide sequence analysis of RepFIC, a basic replicon present in IncFI plasmids P307 and F and its relation to RepA replicon of IncFII plasmids. *J. Bacteriol.* 169:1836-1846.

**Sabaté, M., Miró, E., Navarro, F., Vergés, C., Aliaga, R., Mirelis, B. y Prats, G.** (2002b)  $\beta$ -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *E. coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J. Ant. Chemother.* 49:989-997.

**Sabaté, M., Navarro, F., Miró, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbé, J. y Prats, G.** (2002a) Novel complex *sul1*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. *Ant. Agents Chemother.* 46:2656–2661.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

**Saul, D., Spiers, J., McAnulty, J., Gibbs, M. G., Bergquist, P. L. y Hill, D. F.** (1989) Nucleotide sequence and replication characteristics of RepFIB, a basic replicon of IncF plasmids. *J. Bacteriol.* 171:2697-2707.

**Sawai, T., Mitsuhashi, S. y Yamagishi, S.** (1968) Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of  $\beta$ -lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to  $\alpha$ -aminobenzylpenicillin. *J. Microbiol.* 12:423-434.

**Scaife, J. y Gross, J. D.** (1962) Inhibition of multiplication of an F-lac factor in Hfr cells of *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7:403-407.

**Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. y Heeseman, J.** (1998) Prevalence of the “High-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity* 66:480-485.

**Schwarz, S. y Chaslus-Dancla, E.** (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism of resistance. *Vet. Res.* 32:201-225.

**Sherburne, C. K., Lawley, T. D., Gilmour, M. W., Blattner, F. R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D. J. y Taylor, D. E.** (2000) The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI2 plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* 10:2177-2186.

**Sherley, M., Gordon, D. M. y Collignon, P. J.** (2003) Species differences in plasmid carriage in the *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* 49:79-85.

**Shigekawa, K. y Dower, W. J.** (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques.* 6:742-751.

**Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y. y Arakawa, Y.** (2004) *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 69-75.

**Smalla, K., Heuer, H., Götz, A., Niemeyer, D., Krögerrecklenfort, E. y Tietze, E.** (2000) Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggy manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl. Env. Microbiol.* 66:4854-4862.

**Smith, C. L., Klco, S. R. y Cantor, C. R.** (1988) Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. pág. 41-72. En: *Genome analysis: a practical approach*. Ed: Davies, K. E. IRL Press. Oxford.

**Snyder, L. y Champness, W.** (1997) *Molecular Genetics of Bacteria*. ASM Press, Washington, D. C.

**Sobecky, P. A., Mincer, T. J., Chang, M. C. y Helinski, D. R.** (1997) Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *App. Env. Microbiol.* 63:888-895.

**Soto, S. M., Jiménez de Anta, M. T. y Vila, J.** (2006) Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or-independent pathways, respectively. *Ant. Agents Chemother.* 50:649-653.

**Sougakoff, W., Goussard, S. y Courvalin, P.** (1988) The TEM-3  $\beta$ -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:343-348.

**Stalker, D. M., Kolter, R. y Helinski, D. R.** (1982) Plasmid R6K DNA replication. I. Complete nucleotide sequence of an autonomously replicating segment. *J. Mol. Biol.* 161: 33-43.

**Stalker, D. M., Thomas, C. M. y Helinski, D. R.** (1981) Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181, 8-12.

**Starčič Erjavec, M., Gaastra, W., van Putten, J. y Žgur-Bertok, D.** (2003) Identification of the origin of replications and partial characterization of plasmid pRK100. *Plasmid* 50:102-112.

**Stordeur, P., Marlier, D., Blanco, J., Oswald, E. F., Biet, F., Dho-Moulin, M. y Mainil, J.** (2002) Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Vet. Microbiol.* 84:231-241.

**Summers, D.** (1996) The biology of plasmids. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.

- Swack, J. A., Pal, S. K., Mason, R. J., Abeles, A. L. y Chatteraj, D. K.** (1987) P1 plasmid replication: measurement of initiator protein concentration in vivo. *J. Bacteriol.* 169:3737-3742.
- Sykes, R. B., Cimarusti, C. M., Bonner, D. P., Bush, K., Floyd, D. M., Georgopapdakou, N. H., Koster, W. H., Liu, W. C., Parker, W. L., Príncipe, P. A., Rathnum, M. L., Slusarchyk, W. A., Trejo, W. H. y Wells, J. S.** (1981) Monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotics produces by bacteria. *Nature* 291:489-491.
- Tartoof, K. D. y Hobbs, C. A.** (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9:12.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. y Swaminathan, B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.
- Tomasz, A.** (1979) The mechanism of the irreversible antimicrobial affects of penicillin: How the  $\beta$ -lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:113-137.
- Truscott, R. B.** (1973) Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*. *Can. J. Comp. Med.* 38:160-167.
- Tsutsui, H., Fujiyama, A., Murotzu, T. y Matsubara, K.** (1983) Role of nine repeating sequences en the mini-F genome for expresión of F-specific incompatibility phenotype and copy number control. *J. Bacteriol.* 155:337-344.
- Tzouvelekis, L. S. y Bonomo, R. A.** (1999) SHV-type  $\beta$ -lactamases. *Curr. Pharm. Des.* 5:847-864.
- Tzouvelekis, L. S., Tzelepi, E., Tassios, P. T. y Legakis, N. J.** (2000) CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Ant. Agents* 14:137-143.

**van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K. y Lowe, J.** (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO J.* 21:6935-6943.

**Vandekerchove, D., Vandemale, F., Adriaensen, C., Zaleska, M., Hernalsteens, J. P., De Baets, L., Butaye, P., Van Immerseel, F., Wattiau, P., Laevens, H., Mast, J., Goddeeris, B. y Pasmans, F.** (2005) Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 108:75-87.

**Vila, J., Simon, K., Ruiz, J., Horcajada, J. P., Velasco, M., Barranco, M., Moreno, A. y Mensa, J.** (2002) Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J. Infect. Dis.* 186:1039-1042.

**Wagner, E. G. H., Altuvia, S. y Romby, P.** (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. pág. 361-398. En: *Advances in Genetics*. Eds: Dunlap, J. C. y Wu, C. Academic Press, London, UK.

**Walsh, C.** (2003a) Antibiotics that act on cell wall biosynthesis. pág. 23-49. En: *Antibiotics. Actions, Origins, Resistance*. ASM Press. Washington, D. C.

**Walsh, C.** (2003b). Enzymatic destruction or modification of the antibiotic by resistant bacteria. pág. 107-124. En: *Antibiotics. Actions, origins, resistance*. ASM Press. Washington, D. C.

**Watanabe, E., Wachi, M., Yamasaki, M. y Nagai, K.** (1992) ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F-plasmid. *Mol. Gen. Genet.* 234:346-352.

**Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. y Mitsuhashi, S.** (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ant. Agents Chemother.* 35:147-151.

**Watanabe, T.** (1969) Bacterial episomes and plasmids. *CIBA Found. Symp.* 81-97.

**Weill, F. X., Lailier, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., Grimont, P. A. y Cloeckert, A.** (2004) Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 42:5767-5773.

**Winokur, P. L., Vonstein, D. L., Hoffman, L. J., Uhlenhopp, E. K. y Doern, G. V.** (2001) Evidence for transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Ant. Agents Chemother.* 45:2716-2722.

**Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y. y Yoshida, O.** (1995) Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 12:85-90.

**Yan, J. J., Hong, C. Y., Ko, W. C., Chen, Y. J., Tsai, S. H., Chuang, C. L. y Wu, J. J.** (2004) Dissemination of *bla*<sub>CMY-2</sub> among *Escherichia coli* isolates from food animals, retail ground meats, and humans in southern Taiwan. *Ant. Agents Chemother.* 48:1353-1356.

## ***6. ANEXOS***

---

***ANEXO I***

---

## I. Medios de cultivo

### - Medio agar McConkey

McConkey (Oxoid)	40 g
Agar bacteriológico (Pronadisa)	15 g

Mezclar los componentes y disolverlos en 950 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

### - Agua peptonada

Disolver 25,5 g de agua peptonada (Merck) en 950 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q hasta su total disolución. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

### - LB líquido (Luria-Bertani) (Miller, 1992).

Bacto-triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g

Mezclar los componentes y disolverlos en 950 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

### - LB agar

Contiene la misma composición del medio anterior, excepto el agar bacteriológico (Pronadisa) (17 g por l de medio). Enrasar a un 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

### - LB agar blando (0,7%)

Composición para 100 ml

Bacto-triptona (Pronadisa)	1 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	0,5 g
Agar bacteriológico (Pronadisa)	0,7 g

Mezclar los componentes y disolver en 90 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Enrasar a 100 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

**- Caldo de corazón y cerebro [*Brain Heart Infusion* (BHI)]**

BHI (Oxoid)            37 g

Disolver en 950 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

**- TB (*Terrific Broth*) (Tartof y Hobbs, 1987)**

Triptona (Pronadisa)            12 g  
Extracto de levadura (Pronadisa)    24 g  
Glicerol (Scharlau)            4 ml

Mezclar los componentes en 850 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q hasta su total disolución y enrasar a 900 ml. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Posteriormente, dejar enfriar hasta los 50-55°C y añadir 100 ml de una solución salina estéril, cuya composición se describe a continuación.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac)            2,31 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O (Merck)    16,43 g

Disolver las sales en 80 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q y enrasar a 100 ml. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

**- Medio Mínimo agar AB con glucosa (Clark y Maaløe, 1967)**

Glucosa (Merck)            2 g  
Agar bacteriológico (Difco)    17 g

Mezclar los componentes en 850 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q hasta su total disolución y enrasar a 875 ml. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Dejar enfriar hasta los 50-55°C y añadir, en esterilidad, 100 ml de la solución A estéril y 25 ml de la solución B estéril. Ambas soluciones se describen a continuación:

### - Solución A

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac)	20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	59,99 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	30 g
NaCl (Panreac)	30 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac)	0,11 g

Disolver las sales en 850 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q y enrasar a 1 l. Dispensar en botellas de 100 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

### - Solución B

MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Merck)	16 g en 500 ml
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Merck)	0,58 g en 250 ml
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Panreac)	0,032 g en 250 ml

Disolver cada componente en el volumen indicado y mezclar las tres soluciones. Dispensar en botellas de 100 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

## II. Antibióticos y Aminoácidos

Los distintos medios de cultivo fueron suplementados con diferentes antibióticos y aminoácidos, los cuales se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1.** Antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico	Solvente	Concentración estoc (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Ampicilina (Roche)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	50	50
Sulfato de Kanamicina (Roche)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	50	50
Sulfato de Gentamicina (Roig Farma)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	40	40
Tetraciclina (Sigma)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	17	17
Cefotaxima (Aventis Pharma)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	2	2
Rifampicina (Roig Farma)	Metanol	15	75
Imipenem (MSD)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	4	4

**Tabla 2.** Aminoácidos empleados en este trabajo.

Aminoácido	Solvente	Concentración estoc (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)
Tiamina dicloruro (Merck)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	25	25
L-Leucina (Merck)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	25	25
L-Prolina (Merck)	H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	25	25

<sup>1</sup> H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q, estéril.

Tras la disolución de los componentes, esterilizar por filtración con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore), excepto en el caso de la rifampicina. Conservar las soluciones estoc a -20°C.

### III. Soluciones y tampones

#### - Uso general

##### Azida sódica 2 mM

Azida sódica (Merck)	1,5 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	9 ml

Disolver por agitación y enrasar a 10 ml. Esterilizar por filtración con filtros de 0,45 µm de tamaño medio de poro (Millipore). Conservar a temperatura ambiente resguardada de la luz.

##### Solución de Glicerol al 10%

Glicerol (Scharlau)	10 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	hasta 100 ml

Agitar hasta su total disolución, esterilizar en un autoclave (121°C 15 min). Conservar a 4°C.

##### EDTA 0,5 M pH 8

EDTA (Sigma)	18,62 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	80 ml

Disolver, ajustar el pH a 8 y enrasar a 100 ml. Conservar a temperatura ambiente.

#### **5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactopiranoside (X-Gal)**

X-Gal (Roche Diagnostics SL)	40 mg
<i>N,N</i> -dimetilformamida (Panreac)	1 ml

Conservar a 4°C protegido de la luz. El volumen preparado se emplea en la suplementación de 1 l de medio LB agar.

#### **Sulfato de Magnesio 10 mM**

MgSO <sub>4</sub> (Panreac)	1,56 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 l

Disolver y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

### **- Extracción de DNA y electroforesis convencional**

#### **Solución de CTAB/NaCl**

NaCl (Panreac)	4,1 g
CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Sigma)	10 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	80 ml

Disolver por calor hasta una temperatura máxima de 65°C. Conservar a una temperatura no inferior a los 15°C para evitar la precipitación del CTAB.

#### **Proteinasa K (20 mg/ml)**

Proteinasa K (Roche Diagnostics SL)	0,02 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 ml

Agitar hasta su total disolución y dispensar en volúmenes de 200  $\mu$ l y conservar a -20°C.

**Solución I (2x)**

Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	50 ml
EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	40 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	910 ml

Mezclar todos los componentes y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a 4°C. La solución de trabajo 1x se prepara a partir de una dilución ½ de la solución concentrada 2x.

**SDS 10%**

SDS (Merck)	100 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	900 ml

Agitar hasta su total disolución y ajustar el pH a 7,2. Enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

**NaOH 10 N**

NaOH (Panreac)	40 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	85 ml

Disolver y enrasar en 100 ml. Conservar a temperatura ambiente.

**Solución II**

SDS 10%	5 ml
NaOH 10 N (Panreac)	1 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	44 ml

Conservar a temperatura ambiente.

**Acetato potásico 5 M**

Acetato potásico (Panreac)	294,4 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	400 ml

Disolver y enrasar a 600 ml. Conservar a temperatura ambiente.

### **Solución III**

Acetato potásico 5 M (Panreac)	600 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	115 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	200 ml

Mezclar todos los componentes y ajustar el pH a 4,8. Enrasar a 1 l y conservar a temperatura ambiente, aunque en el momento de su utilización debe estar a 4°C.

### **Fenol/cloroformo**

Cloroformo/isoamílico	250 ml
Fenol (Panreac) bidestilado	250 ml

Medir los 250 ml de fenol con una probeta y esperar a que se separen las dos fases. Aspirar la fase superior y añadir la solución de cloroformo isoamílico dejando reposar la mezcla a 37°C durante 12-18 h. Conservar a 4°C en una botella de vidrio en oscuridad.

### **Cloroformo/isoamílico (24:1)**

Cloroformo (Carlo Erba Reagenti)	480 ml
3-metil-1-butanol (Etanol isoamílico) (Panreac)	20 ml

Mezclar y conservar a temperatura ambiente.

### **Acetato sódico 3 M (pH 4,8)**

Acetato sódico · 3 H <sub>2</sub> O (Panreac)	40,81 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	85 ml

Disolver y enrasar hasta un volumen de 100 ml. Ajustar el pH a 4,8 y esterilizar en un autoclave (121°C 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

**Etanol al 70%**

Etanol absoluto (Carlo Erba Reagenti )	70 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	30 ml

Mezclar y conservar a - 20°C.

**Tampón TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM)**

EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	2 ml
Tris-HCl 1 M pH 7,4 (AppliChem)	1 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	97 ml

Esterilizar en un autoclave y conservar a temperatura ambiente.

**RNasaI (20 mg/ml)**

RNasa (Roche Diagnostics SL)	0,02 g
Tris-Cl 1 M pH 7,4 (AppliChem)	10 µl
NaCl 5 M (AppliChem)	3 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	987 µl

Agitar hasta su total disolución y hervir a 100°C durante 15 min para la activación de la enzima. Dispensar en volúmenes de 25 µl y conservar a -20°C. La solución de trabajo (1mg/ml) se obtiene añadiendo 500 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM) a la alícuota de 25 µl.

**Solución transportadora 6x**

Glicerol (Scharlau)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	2 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	90 ml

Mezclar todos los colorantes con el glicerol y posteriormente añadir la solución de EDTA. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente, resguardada de la luz.

### **TAE 50x**

Tris-Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	750 ml

Mezclar todos los componentes hasta su completa disolución, enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

### **- Soluciones y Tampones utilizados en la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE)**

#### **PET IV (Tris-HCl 10 mM; NaCl 1 M)**

Tris-Cl 1 M pH 7,4 (AppliChem)	10 ml
NaCl (Panreac)	58,4 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	900 ml

Disolver los componentes, ajustar el pH a 7,6 y enrasar a 1 l. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

#### **TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8)**

Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	5 ml
EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	1 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	490 ml

Mezclar los componentes, enrasar a 500 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

#### **Lisozima (100 mg/ml)**

Lisozima (Roche Diagnostics SL)	100 mg
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 ml

Agitar energicamente hasta su completa disolución y conservar a - 20°C.

**Tampón de lisis I** (Tris-HCl 6 mM; NaCl 1 M; EDTA 0,1 M; SLS 0,5%; deoxicolato 0,2%)

Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	0,6 ml
NaCl 5 M (AppliChem)	20 ml
EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)	20 ml
N-lauroil sarcosina (Sigma)	0,5 g
Ácido deoxicólico (Sigma)	0,2 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	55 ml

Enrasar a 100 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

**Pronasa** (100 mg/ml)

Pronasa (Roche Diagnostics SL)	100 mg
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 ml

Agitar enérgicamente hasta su completa disolución y conservar a - 20°C.

**Tampón de lisis II** (EDTA 0,5 M; 1 % N-lauroil Sarcosina; SLS 1%; pH 9-9,5)

EDTA (Sigma)	46,5 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	237,5 ml
N-lauroil sarcosina (Sigma)	12,5 ml

Disolver el EDTA en H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q y ajustar el pH a 9-9,5. Enrasar a 237,5 ml y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). En el momento de su utilización, añadir el volumen necesario de N-lauroil sarcosina (Sigma) preparado a una concentración del 20% (20 g en 100 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q estéril). Conservar a temperatura ambiente.

**Tampón de incubación de la nucleasa *SI*** (Acetato de sodio 33 mM; NaCl 50 mM; ZnSO<sub>4</sub> 0,033 mM; pH 4,5)

Acetato de sodio 3 M (Panreac)	550 µl
NaCl 5 M (AppliChem)	500 µl
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (3,3 mM) (Merck)	500 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	hasta 50 ml

Mezclar todos los componentes, ajustar el pH a 4,5 y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a 4°C.

### **TBE 10x**

Tris Base (Sigma)	121,1 g
Ácido bórico (Sigma)	61,8 g
EDTA (Sigma)	0,745 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 l

Mezclar todos los componentes hasta su completa disolución, ajustar el pH a 7,5-8 y enrasar a 1 l. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min) y conservar a temperatura ambiente.

### **TBE 0,5x**

En el momento de su utilización, hacer una dilución 1/20 del tampón TBE 10x con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q.

### **Tampón de tinción de geles**

Bromuro de etidio (10 mg/ml) (Amresco)	40 µl
Tampón TBE 0,5x	500 ml

Dejar teñir sin agitación aproximadamente durante 2 h.

**- Soluciones y tampones utilizados en las técnicas de hibridación con sondas frías *dot blot* y *Southern***

**HCl 0,25 M**

HCl 37% (Panreac)	22 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	987 ml

Agitar hasta su total disolución y conservar a temperatura ambiente.

**NaOH 0,4 M**

NaOH (Panreac)	16 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 l

Agitar hasta su total disolución y conservar a temperatura ambiente.

**SSPE 10x**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O (Panreac)	26,81 g
NaCl (Panreac)	105,12 g
EDTA (Sigma)	3,7 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	700 ml

Disolver todos los componentes y ajustar el pH a 7,4. Enrasar a 1 l y esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min).

**Solución SSC 20x**

NaCl (Panreac)	175 g
Citrato sódico tribásico (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	900 ml

Disolver todos los componentes y enrasar a 1 l. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min) y conservar a temperatura ambiente.

### **SSC 2x**

Hacer una dilución 1/10 de la solución SSC 20x con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Esterilizar, si se desea, en un autoclave (121°C durante 15 min) y conservar a temperatura ambiente.

### **Cloruro de Litio 8 M**

LiCl <sub>2</sub> (Panreac)	3,38 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	10 ml

Disolver y esterilizar por filtración con filtros de 0,45 µm de diámetro (Millipore). Conservar a 4°C.

### **Solución de prehibridación**

N-lauroil Sarcosina (Sigma)	0,2 g
Leche en polvo Molico (Nestlé)	4 g
SSC 20x	50 ml
SDS 10% (Merck)	400 µL
Formamida (Roche Diagnostics SL)	100 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	50 ml

Disolver todos los componentes. Conservar a - 20°C y en oscuridad.

### **Solución de hibridación**

Contiene los mismos compuestos que la solución de prehibridación pero, además, se le añade la sonda de DNA marcada con digoxigenina.

### **Solución I de lavado (SSC 2x; 0,1% SDS)**

SDS 10% (Merck)	10 ml
SSC 20x	100 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	890 ml

Mezclar todos los componentes hasta su completa disolución. Conservar a temperatura ambiente.

**Solución II de lavado (SSC 0,1x; 0,1% SDS)**

SDS 10% (Merck)	10 ml
SSC 20x	5 ml
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	985 ml

Mezclar todos los componentes hasta su completa disolución. Conservar a temperatura ambiente.

**PBS 10x**

NaCl (Panreac)	80 g
KCl (Panreac)	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Panreac)	14,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac)	2,4 g

Disolver todos los componentes en 900 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Ajustar el pH a 7,4 y enrasar a 1 l. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

**PBS 1x**

Hacer una dilución 1/10 del tampón PBS 10x con H<sub>2</sub>O ultrapura grado Milli-Q. Esterilizar, si se desea, en un autoclave (121°C durante 15 min). Conservar a temperatura ambiente.

**Solución de bloqueo**

Leche en polvo Molico (Nestlé)	1 g
PBS 1x	100 ml

Agitar hasta su completa disolución.

### **Tampón III de revelado**

NaCl (Panreac)	5,8 g
Tris-HCl (Sigma)	0,8 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Merck)	10 g
Tris-Base (Sigma)	11,58 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	800 ml

Mezclar todos los componentes hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 9,5 y enrasar a 1 l. Esterilizar en un autoclave (121°C durante 15 min) y conservar a temperatura ambiente.

### **NBT (cloruro de 4-nitroazul tetrazolio)**

NBT (Roche Diagnostics SL)	75 mg
<i>N,N</i> -dimetilformamida (Panreac)	700 µl
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	300 µl

Disolver en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) y conservar a - 20°C.

### **BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato)**

BCIP (Roche Diagnostics SL)	50 mg
<i>N,N</i> -dimetilformamida (Panreac)	1 ml

Disolver en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) y conservar a - 20 °C.

### **Solución colorimétrica**

NBT (Roche Diagnostics SL)	45 µl
BCIP (Roche Diagnostics SL)	35 µl
tampón III de revelado	10 ml

Preparar la solución justo en el momento de ser utilizada, ya que es fotosensible. BCIP y NBT actúan en un sistema de óxido-reducción disueltos en tampón III de revelado. El BCIP es oxidado bajo la acción de la fosfatasa alcalina por eliminación del grupo fosfato y

paralelamente, el NBT es reducido a diformazán. Los productos de reacción forman un precipitado insoluble en agua de color azul oscuro.

**Solución de deshibridación** (NaOH 0,2 M; SDS 0,1%)

SDS (Merck)	1 g
NaOH (Panreac)	8 g
H <sub>2</sub> O ultrapura grado Milli-Q	1 l

Agitar hasta su total disolución y conservar a temperatura ambiente.

***ANEXO II***

---

Short communication

## ESBL- and plasmidic class C $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms

Vanessa Blanc<sup>a</sup>, Raul Mesa<sup>a,b</sup>, Montserrat Saco<sup>c</sup>, Susana Lavilla<sup>d</sup>,  
Guillem Prats<sup>a,d</sup>, Elisenda Miró<sup>b</sup>, Ferran Navarro<sup>a,b</sup>, Pilar Cortés<sup>a</sup>,  
Montserrat Llagostera<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

<sup>b</sup> *Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain*

<sup>c</sup> *Laboratori de Sanitat Ramadera, DARP, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain*

<sup>d</sup> *Servei de Microbiologia, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain*

<sup>e</sup> *Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Cerdanyola del Vallès, Bellaterra, Spain*

Received 30 March 2006; received in revised form 26 July 2006; accepted 1 August 2006

---

### Abstract

This study aims to determine the presence of extended-spectrum (ESBL) and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in poultry, pig and rabbit farms of Catalonia (Spain). PFGE typing showed a low clonal relationship among strains carrying these mechanisms of resistance. Ninety-three percent of them were resistant to two or more of the non- $\beta$ -lactam antimicrobials tested and harboured ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases. Greater diversity of these enzymes was found in strains from poultry farms, the CTX-M-9 family, especially CTX-M-14, with CMY-2 being the most frequent. The isolation of TEM-52 and SHV-2-producing *Escherichia coli* strains from these animal farms is noteworthy. In contrast, 73% of the strains from pig farms had CTX-M-1, and neither the CMY-type nor CTX-M-9 family enzyme was found. Likewise, it is the first time that CTX-M-1 and SHV-5 encoding strains have been isolated in pigs. On the other hand, in rabbit farms CTX-M-9 family was also the most frequent, being detected in three of a total of four strains. The last one showed a CMY-2, for the first time detected in these animals, too. In conclusion, commensal *E. coli* strains of food-producing animal farms are a reservoir of ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* ESBL; Plasmidic class C; *Enterobacteriaceae*; *Escherichia coli*; Poultry; Pig and rabbit farms

---

### 1. Introduction

Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases have emerged as clinically relevant antimicrobial resistance mechanisms (Nordmann, 1998; Bradford, 2001). *Enterobacteriaceae*

---

\* Corresponding author at: Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Bellaterra, Spain. Tel.: +34 935813013.

*E-mail address:* [montserrat.llagostera@uab.es](mailto:montserrat.llagostera@uab.es) (M. Llagostera).

harbouring these enzymes include different pathogens of animals and humans and also commensals of their intestinal tracts, such as *Escherichia coli*, which can be a reservoir of these resistances.

Since the first ESBL was reported in the mid-1980s, a significant number of reports concerning not only ESBL but also plasmidic class C  $\beta$ -lactamases, like those of the CMY family from both human clinical and community isolates, have been published (Nordmann, 1998; Bradford, 2001; Philippon et al., 2002; Bonnet, 2004; Pitout et al., 2005). Recently, several studies concerning *E. coli* and *Salmonella* strains producing these enzymes, isolated from farm animals, have been published to date in the European Union (Briñas et al., 2003; Aarestrup et al., 2004; Liebana et al., 2004; Weill et al., 2004; Briñas et al., 2005; Hasman et al., 2005) and other countries (Winokur et al., 2001; Shiraki et al., 2004).

Since commensal bacterial strains isolated particularly from production animals can be a worrying reservoir of antibacterial resistance genes, one relevant topic is to ascertain the abundance and prevalence of these enzymes as well as to know the mechanisms involved in their selection. In order to contribute to this knowledge, we began a wide epidemiological research of ESBL-, plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains in different environments (Mesa et al., 2006). In this paper, the characterization of the isolated strains from poultry, pig and rabbit farms from Catalonia (Spain) and the identification of those enzymes are given in detail.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of ESBL-, plasmidic class C $\beta$ -lactamase-producing strains from animal farms

The farms studied are representative of the different geographical areas of Catalonia and were selected by the Veterinary Service of the Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya. All of them practiced intensive farming of fattening pigs, broilers and rabbits. Animals were housed indoors. Sampling and microbiological methods utilized were as described (Mesa et al., 2006).

### 2.2. Antimicrobial susceptibility test

Susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics and ESBL-producing isolates were determined as reported (Mesa et al., 2006). Strains suggestive of expressing plasmid-mediated AmpC enzymes were those showing intermediate resistance or resistance to amoxicillin/clavulanic acid, as well as to cefotaxime or ceftazidime, according to CLSI breakpoints (NCCLS, 2003), and negative results for ESBL production. Those strains expressing the chromosomal-inducible AmpC enzyme were detected as described (Mirelis et al., 2006) and disregarded. *E. coli* ATCC 25922 and ATCC 35218 were used as controls.

### 2.3. ERIC-PCR

ERIC-PCR was performed with the oligonucleotide ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), as previously described (Versalovic et al., 1991). The ERIC-PCR profile was used for the first clonal delineation of isolates within each farm. One representative per clone was selected for further studies.

### 2.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Bacterial DNA was prepared as previously described (García et al., 2005) and digested with the *Xba*I restriction enzyme. Electrophoresis was performed with a CHEF DRIII System (BioRad; Richmond, CA) in the appropriate conditions for the enzyme. PFGE patterns were analysed with the Fingerprinting II programme (Bio Rad; Richmond, CA). Strains sharing three or fewer bands of difference were considered related, whereas those with more than three were regarded as unrelated (Tenover et al., 1995).

### 2.5. Characterization of ESBL and plasmidic class C $\beta$ -lactamases

Detection and characterization of  $\beta$ -lactamases by isoelectric focusing (IEF), PCR amplification and DNA sequencing were performed as previously described (Sabaté et al., 2002a; Miró et al., 2005). Nucleotide and deduced-protein sequences were analysed using the DNASTAR Lasergene software

package and the National Centre for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3. Results

Our approach to study the abundance of *Enterobacteriaceae* strains, harbouring ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases in animal farms for food production, was based on the isolation of these bacteria from faecal material of ten sampling points of each farm. Among the 360 isolates (192 from poultry, 131 from pigs and 37 from rabbits) that grew on the selective plates, a total of 337 shared a resistance pattern compatible with these  $\beta$ -lactamases. Through the ERIC-PCR profile, 107 clones were delineated. All of them were *E. coli*, with the exception of one *E. cloacae*, isolated from one rabbit farm. It must be

noted that some clones were widely distributed in a specific farm, whereas few colonies were obtained from others. Afterwards, they were studied by PFGE. Sixty-two, 37 and 4 different PFGE patterns from poultry, pig and rabbit farms, respectively, were obtained. Only seven clones, classified as different by ERIC-PCR profiles, differed by three or fewer bands in their PFGE patterns.

The results of the  $\beta$ -lactamase characterization are presented in Table 1, as well as the distribution of these enzymes in the different farms studied. 59.8% of the isolated strains came from poultry farms; the CTX-M-9 group was the most frequently identified, especially CTX-M-14. CMY-2 was the second most frequent enzyme. In addition, only two strains from one poultry farm had the TEM-52 enzyme, which was the only TEM-type enzyme identified in this work. 36.5% of the isolated strains were from pig farms.

Table 1  
ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases identified in the strains isolated from poultry, pig and rabbit farms

Farm	Enzyme	Number of strains										Total	Percentage <sup>a</sup>	
		Farm number												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Poultry	ESBL	TEM-52					2						2	3.1
		SHV-12	1		2			1				1	5	7.8
		CTX-M-1						1					1	1.6
		CTX-M-9	1	1		1	1	3		1		1	9	14.1
		CTX-M-14	4	7	5	1	4	1	4		1	2	29	45.3
		CTX-M-32			1					1			2	3.1
		CTX-M-14 + CTX-M-1						1					1	1.6
		SHV-5 + CTX-M-9		1									1	1.6
		SHV-2 + CTX-M-1							1				1	1.6
		Plasmidic class C $\beta$ -lactamase											13	20.3
	CMY-2	3	1	2		5		1			1	13	20.3	
Pigs	ESBL	SHV-5	1	3								4	10.3	
		SHV-12			1		2	1		3	1	8	20.5	
		CTX-M-1	2	2	5	18						27	69.2	
													4	
Rabbits	ESBL	CTX-M-9	1									1	25.0	
		CTX-M-14	2									2	50.0	
		Plasmidic class C $\beta$ -lactamase											1	25.0
		CMY-2			1								1	25.0

<sup>a</sup> Percentage which refers to the total number of strains isolated from each kind of farm.

In this case, CTX-M-1 was the only enzyme identified of the CTX-M family, and plasmidic class C enzymes were not found. Finally, only 3.7% of isolated strains came from rabbit farms. The CTX-M-9 group was the most frequently identified. It is important to emphasize the first detection of CMY-2 in this kind of animal farms. The number of strains carrying SHV enzymes was low, but they were identified both in poultry and in pig farms. All strains only produced one enzyme, with the exception of three of them, isolated from three poultry farms, which had two enzymes (Table 1).

With respect to the pattern of resistance of these strains to non- $\beta$ -lactam antimicrobials, 93% of them were resistant to more than two of the antibacterial compounds tested, and only one, isolated from a pig farm and carrying a CTX-M-1  $\beta$ -lactamase, was susceptible to all of them. Almost 83% of the strains from poultry and pig farms were resistant to tetracycline (TET) and 65% to sulphonamide (SSS) (Table 2). However, about 90% of the strains from poultry farms were resistant to nalidixic acid (NAL), whilst only 53.8% from pig farms presented this resistance. Three of the four strains isolated from rabbit farms were resistant to NAL, SSS and TET.

Table 2

Number and percentage of resistances to non- $\beta$ -lactam antimicrobial compounds of ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing strains, isolated from poultry, pig and rabbit farms

Antibacterial compound <sup>a</sup>	No. of resistant strains (%) <sup>b</sup>		
	Poultry	Pigs	Rabbits
CHL	20 (31.2)	14 (35.9)	1 (25.0)
FZD	11 (17.2)	16 (41.0)	1 (25.0)
TET	52 (81.2)	33 (84.6)	3 (75.0)
CIP	20 (31.2)	13 (33.3)	1 (25.0)
NAL	57 (89.1)	21 (53.8)	3 (75.0)
GEN	5 (7.8)	4 (10.3)	1 (25.0)
KAN	11 (17.2)	8 (20.5)	2 (50.0)
STR	44 (68.7)	22 (56.4)	1 (25.0)
TOB	5 (7.8)	6 (15.4)	2 (50.0)
SSS	43 (67.2)	25 (64.1)	3 (75.0)
TMP	31 (48.4)	26 (66.7)	1 (25.0)
SXT	28 (43.7)	21 (53.8)	1 (25.0)

<sup>a</sup> Chloramphenicol (CHL); furazolidone (FZD); tetracycline (TET); ciprofloxacin (CIP); nalidixic acid (NAL); gentamicin (GEN); kanamycin (KAN); tobramycin (TOB); sulphonamide (SSS); trimethoprim (TMP); trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT).

<sup>b</sup> Percentage which refers to the total number of strains isolated from each kind of farm.

#### 4. Discussion

The aim of this work is to study if commensal *Enterobacteriaceae* of food-producing animal farms can be a reservoir of ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases in order to define the problems of antimicrobial resistance, as well as to know the selection mechanisms of these resistances. Our results clearly show that these  $\beta$ -lactamases are present in all of the farms studied, and that they are mainly carried by *E. coli* strains which are, in general, multiresistant to non- $\beta$ -lactam antibiotics. The low genetic homology observed among the strains, even within a single farm, is remarkable. This fact emphasizes the importance of sampling different points of the farm. It is stressed that the highest diversity of these enzymes was found in poultry farms in which the CTX-M-9 family was the most abundant. This result is similar to those found in *E. coli* clinical isolates in Spain (Sabaté et al., 2002a; Bou et al., 2002). Moreover, to our knowledge, this is the first time that CMY-2-producing *E. coli* strains have been isolated from rabbits. Only one TEM-52 had been described in one *E. coli* isolated from rabbit lung (Briñas et al., 2005). Likewise, neither the isolation of TEM-52- and SHV-2-producing *E. coli* strains from poultry nor *E. coli* strains encoding the SHV-5 and CTX-M-1 enzyme from pigs had been reported yet.

Although there are differences among countries in the use of antibacterial agents in the treatment of animals, tetracyclines are the antibacterial class used most frequently (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). Likewise, amoxicillin, combined with clavulanic acid, is one of the most-used penicillins, whereas the treatment with extended-spectrum cephalosporins and cephamycins is very unusual. Taking into account these practices, a possible reason for the presence of these  $\beta$ -lactamases in bacteria from food-producing animals is the possibility of a co-selection by the administration of other non- $\beta$ -lactam antibiotics whose resistance genes, commonly located in plasmids, are included in the same mobile element, like transposons or even integrons, as has been extensively studied for *bla*<sub>CTX-M</sub> genes (Bonnet, 2004; García et al., 2005). In fact, almost all CTX-M-9-producing strains isolated in this work are also resistant to streptomycin (STR), SSS and trimethoprim (TMP)

(data not shown), which must be related to the selection of the unusual Class 1 integron which, besides the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene, codifies *sul1*, *dfrA16* and *aadA2* genes responsible for those resistances (Sabaté et al., 2002b). The aforementioned point could explain the co-selection of the CMY-2-producing strains in poultry farms, because they were mostly resistant to chloramphenicol, sulphonamide, streptomycin and tetracycline (data not shown). However, the reasons for the selection of CTX-M-14- and CTX-M-1-producing strains, which are the main ESBL isolated in poultry and pig farms, respectively, are not clear because they did not present a similar resistance pattern to non- $\beta$ -lactam antimicrobials.

In addition to that mentioned above, the low number of  $\beta$ -lactamase-harboring strains isolated from rabbit farms has a particular interest. There were only four strains isolated from the 100 samples analysed, three of them (one of the *E. cloacae*) being from the same farm. The fact that  $\beta$ -lactam antibiotics are not recommended to treat rabbits, because they produce enteritis or enterotoxaemia, could indicate the absence of antimicrobial pressure for the emergence of  $\beta$ -lactamase-producing strains. In addition, these results strongly suggest that the use of  $\beta$ -lactam antibiotics could exercise a first selective pressure in the emergence of these resistances.

In conclusion, commensal *E. coli* of the gastrointestinal microbiota of food-producing animals is a reservoir of ESBL and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases, whose transference to pathogenic bacteria should not be ruled out. Treatment of animals with  $\beta$ -lactam antibiotics seems to be on the basis of selection of these antimicrobial resistances, which must be further co-selected by the use of other antimicrobials.

## Acknowledgements

This work was partially supported by Grants PI020372, PI020358, and PI020918 from the “Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social de España”, 2005SGR 533 from the Generalitat de Catalunya and from the “Red Española de Investigación en Patología Infecciosa” (REIPI). V. Blanc was a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain). We acknowledge our English-teaching university colleague,

Chuck Simmons, for his help in the language revision and correction of this article.

## References

- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Olsen, I., Sorensen, G., 2004. International spread of *bla*<sub>CMY-2</sub>-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1916–1917.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1–14.
- Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951.
- Briñas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Sáenz, Y., García, M., Domínguez, L., Torres, C., 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2056–2058.
- Briñas, L., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Porrero, M.C., Domínguez, L., Torres, C., 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1262–1264.
- Bou, G., Cartelle, M., Tomás, M., Canle, D., Molina, F., Moure, R., Eiros, J.M., Guerrero, A., 2002. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14  $\beta$ -lactamase in different *Escherichia coli* strains in the Northwest area of Spain. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4030–4036.
- García, A., Navarro, F., Miró, E., Mirelis, B., Campoy, S., Coll, P., 2005. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 819–826.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F.M., 2005.  $\beta$ -Lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 115–121.
- Liebana, E., Gibbs, M., Clouting, C., Barker, L., Clifton-Hadley, F.A., Pleydell, E., Abdalhamid, B., Hanson, N.D., Martin, L., Poppe, C., Davies, R.H., 2004. Characterization of  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb. Drug Resist.* 10, 1–9.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortés, P., Gonzalez, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tortola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G., Navarro, F., 2006. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 211–215.
- Mirelis, B., Rivera, A., Miró, E., Mesa, R.J., Navarro, F., Coll, P., 2006. A simple phenotypic method to differentiate acquired from chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli*. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 24, 370–372.

- Miró, E., Mirelis, B., Navarro, F., Rivera, A., Mesa, R.J., Roig, M.C., Gómez, L., Coll, P., 2005. Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1152–1155.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 8th informational supplement: approved standard M2-A8. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Nordmann, P., 1998. Trends in  $\beta$ -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis. Suppl.* 1, S100–S106.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., 2002. Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1–11.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L., 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 52–59.
- Sabaté, M., Miró, E., Navarro, F., Vergés, C., Aliaga, R., Mirelis, B., Prats, G., 2002a.  $\beta$ -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 497–989.
- Sabaté, M., Navarro, F., Miró, E., Campoy, S., Mirelis, B., Barbé, J., Prats, G., 2002b. Novel complex *sulI*-type integron in *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CTX-M-9</sub>. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2656–2661.
- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201–225.
- Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., Arakawa, Y., 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 69–75.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831.
- Weill, F.X., Lailier, R., Praud, K., Kerouanton, A., Fabre, L., Brisabois, A., Grimont, P.A., Cloeckaert, A., 2004. Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5767–5773.
- Winokur, P.L., Vonstein, D.L., Hoffman, L.J., Uhlenhopp, E.K., Doern, G.V., 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2716–2722.

***ANEXO III***

---



ELSEVIER

International Journal of Antimicrobial Agents xxx (2007) xxx–xxx

INTERNATIONAL JOURNAL OF  
Antimicrobial  
Agents

www.ischemo.org

3

## Letter to the Editor

**Characterisation of plasmids encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and CMY-2 in *Escherichia coli* isolated from animal farms**

Sir,

Enterobacteriaceae harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases are significant pathogens among human clinical isolates. Most of the genes encoding these  $\beta$ -lactamases are located on plasmids that may also codify for non- $\beta$ -lactam resistance. Animals for food production have been considered as a reservoir of antimicrobial resistance. However, only two studies have involved Inc typing of plasmids encoding ESBLs and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases isolated from farm animals [1,2].

Twenty-four epidemiologically unrelated ESBL- or CMY-2-producing strains from our collection of Enterobacteriaceae, isolated from animal farms (Catalonia, Spain) [3], were mated. All were *Escherichia coli*, with the exception of one strain of *Enterobacter cloacae*. Transconjugants were plated on Lauria–Bertani agar supplemented with cefotaxime (2 mg/L) and the appropriate antibiotics to select the receptor strain. Three clones were isolated from each mating and studied in greater detail. Of the 24 donor strains, 20 (83%) carried one ESBL or CMY-2 conjugative plasmid (Table 1). The mating frequencies ranged from  $1.17 \times 10^{-3}$  to  $1.18 \times 10^{-2}$  colony-forming units/mL, and more than one plasmid was transferred in almost one-half (46%) of the transconjugants. Two of the three transconjugant clones isolated from matings with four donor strains had distinct antibiotic resistance patterns (Table 1) and were studied individually. Ten transconjugants also showed resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics; sulphonamide resistance was found in 80% of these 10 transconjugants and 50% of them were resistant to either tetracycline or chloramphenicol. Similarly, 20% expressed combined resistance to kanamycin, tobramycin and gentamicin. Co-transmission of resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics was mainly associated with CMY-2. This supports our earlier suggestion that CMY-2-producing strains could be selected by treating animals with non- $\beta$ -lactam antibacterial compounds [3]. This type of selective pressure may also result in the selection of some CTX-M-1- and CTX-M-14-producing strains, since they also are

resistant to sulfonamide, tetracycline or chloramphenicol. However, other strains carrying those  $\beta$ -lactamases do not show resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotics. This result is consistent with the idea that co-selection through the use of other antimicrobials may not play an important role in the maintenance of *bla*<sub>CTX-M</sub>-mediated resistance [2]. Similarly, the plasmid encoding CTX-M-9 did not exhibit the sulfonamide and trimethoprim resistances usually associated with the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene. This agrees with the high variation reported for the regions surrounding this gene [4,5].

Data obtained following S1 nuclease digestion and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed the sizes of conjugative plasmids encoding  $\beta$ -lactamase to be between 40 kb and 204 kb (Table 1). After different cloning strategies and DNA sequencing, specific oligonucleotide primers for fourteen *inc*/*rep* functions were designed to obtain probes easily in sufficient amounts by polymerase chain reaction. An initial and simple screening of the putative Inc group was done by dot-blot hybridisation with digoxigenin-labelled probes (Roche Diagnostics, Germany). Those probes identified as positive were used to distinguish specific plasmid-borne  $\beta$ -lactamases by Southern hybridisation of PFGE gels. Afterwards, re-hybridisations were done with the ESBL and CMY-2 probes using the ECL kit (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Cross-hybridisation of I1 and FII probes [6] was resolved by DNA sequencing of replicons. The results showed that plasmids hybridising with the I1 probe belonged to the IncK group and putative IncFII plasmids belonged to the IncFII(1) [1] group. In addition, IncQ plasmids contained the described repA/C<sub>2</sub> replicon variant [1,7].

Plasmids from pig farms belonged to the IncN group, and in 71% of cases they were associated with the CTX-M-1 enzyme. Likewise, although in poultry farms there was a greater diversity of  $\beta$ -lactamase enzymes and Inc groups, IncN plasmids (40–46 kb) also encoded enzymes of the CTX-M-1 group. CTX-M-9 and CTX-M-14 enzymes were codified by IncK plasmids (94–124 kb) in isolates both from poultry and rabbit farms. In a recent study, CTX-M-14 was also encoded on an IncK plasmid [1]. However, strains carrying CTX-M-9 enzymes from human isolates were associated with IncHI2 [1,4].

Table 1  
Characteristics of donor and transconjugant strains and replicon typing of  $\beta$ -lactamase-encoding plasmids

Donor strain				Transconjugant strain				
Farm type	Strain	Enzyme	Resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotic	Enzyme	Resistance to non- $\beta$ -lactam antibiotic	Plasmid <sup>a</sup>		
						Number	Size (kb)	Inc group
Rabbit	COC003 <sup>b</sup>	CTX-M-14	NAL, SUL, TET	CTX-M-14	–	2	<b>100/54</b>	<b>K/–</b>
				CTX-M-14	TET	2	156/ <b>101</b>	<b>–/K</b>
Pig	POC001	CTX-M-1	KAN, SUL, SXT, TET, TMP, TOB	CTX-M-1	–	1	<b>42</b>	<b>N</b>
	POC002	CTX-M-1	TET	CTX-M-1	–	2	103/ <b>46</b>	<b>FII/N</b>
	POC018 <sup>b</sup>	CTX-M-1	SUL, STR, SXT, TMP	CTX-M-1	–	2	383/ <b>44</b>	<b>–/N</b>
				CTX-M-1	SUL	2	377/ <b>44</b>	<b>Q/N</b>
	POC020	CTX-M-1	CHL, CIP, KAN, NAL, FZD, SUL, SXT, TET, TMP	CTX-M-1	–	1	<b>42</b>	<b>N</b>
	POC022	CTX-M-1	FZD, STR, TET, TMP	CTX-M-1	–	1	<b>43</b>	<b>N</b>
	POC005	SHV-5	CHL, NAL, STR, TET, TMP	SHV-5	–	2	364/ <b>42</b>	<b>–/N</b>
	POC034	SHV-12	CHL, CIP, FZD, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TMP, TOB, TET	SHV-12	–	1	<b>43</b>	<b>N</b>
Poultry	GOC042	SHV-2 + CTX-M-1	SUL, TET	CTX-M-1	SUL	1	<b>45</b>	<b>N</b>
	GOC044	CTX-M-1	CHL, CIP, NAL, TET	CTX-M-1	–	1	<b>44</b>	<b>N</b>
	GOC051 <sup>b</sup>	CTX-M-14 + CTX-M-1	NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-1	–	1	<b>40</b>	<b>N</b>
				CTX-M-1	SUL	2	354/ <b>40</b>	<b>Q/N</b>
	GOC056	CTX-M-32	CHL, CIP, NAL, SUL, STR, TET	CTX-M-32	–	1	<b>43</b>	<b>N</b>
	GOC012 <sup>b</sup>	CTX-M-9	CHL, CIP, FZD, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-9	–	1	<b>96</b>	<b>K</b>
				CTX-M-9	CHL, SUL, TET	1	96	<b>FII and K<sup>c</sup></b>
	GOC005	CTX-M-14	CHL, CIP, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP	CTX-M-14	–	3	117/ <b>99/53</b>	<b>–/K/–</b>
	GOC025	CTX-M-14	CHL, CIP, NAL, SUL, TET	CTX-M-14	SUL, CHL	2	<b>94/41</b>	<b>FII and K/FII</b>
	GOC059	CTX-M-14	SUL, STR	CTX-M-14	SUL	2	<b>124/49</b>	<b>K/–</b>
	GOC001	CMY-2	CHL, CIP, NAL, SUL, STR, TET	CMY-2	CHL, SUL, TET	1	<b>91</b>	<b>Q and A/C<sub>2</sub></b>
	GOC007	CMY-2	CHL, GEN, KAN, NAL, SUL, STR, SXT, TET, TMP, TOB	CMY-2	KAN, GEN, TOB, CHL, SUL, TET	1	<b>200</b>	<b>Q, A/C<sub>2</sub> and N</b>
	GOC032	CMY-2	CHL, GEN, KAN, SUL, STR, TET, TOB	CMY-2	KAN, GEN, TOB	1	<b>204</b>	<b>Q and A/C<sub>2</sub></b>
	GOC063	SHV-12	CIP, NAL, TMP	SHV-12	–	2	<b>81/35</b>	<b>FII/–</b>

NAL, nalidixic acid; SUL, sulphonamides; TET, tetracycline; KAN, kanamycin; SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole; TMP, trimethoprim; TOB, tobramycin; STR, streptomycin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; FZD, furazolidone; GEN, gentamicin; –, not identified.

<sup>a</sup> Size and Inc group of  $\beta$ -lactamase-encoding plasmids are marked in bold.

<sup>b</sup> Two transconjugants of this donor strain were independently studied because their resistance patterns to non- $\beta$ -lactam antimicrobials differed.

<sup>c</sup> This transconjugant must contain two different plasmids (one IncK and the other FIIA) but similar in size, since the other transconjugant of this donor carries a 96 kb IncK plasmid encoding CTX-M-9.

The three CMY-2 enzymes were encoded on plasmids carrying two replicons (IncQ and IncA/C<sub>2</sub>). It would be interesting to know whether the IncA/C plasmids encoding CMY-2, described by others [1,7], also belong to the IncQ group. Plasmids (*bla*<sub>SHV</sub>) isolated from pig farms belonged to the IncN group, whereas SHV-12 obtained from a poultry farm contained an FII replicon.

Our results point to a high degree of correlation between Inc group, plasmid size and β-lactamase enzyme. Consequently, it may be speculated that one of the mechanisms of dissemination of CMY-2, as well as each of the CTX-M groups, involved the spread of a single, highly transmissible Inc ancestor plasmid that then evolved further. Our results also suggest that certain plasmids harboured in commensal *E. coli* of animal farms for food production act as reservoirs of these transmissible resistances, which may be spread to humans by food-borne transmission.

### Acknowledgments

We are deeply indebted to Drs M. Couturier, A. Toukarian and A. Carattoli for providing the plasmids. Special thanks to Dr A. Carattoli for critical review of this letter.

**Funding:** Supported by the FIS (Spain) (PI020372, PI020358 and PI020918) and the Generalitat de Catalunya (2005SGR533).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

### References

- [1] Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3203–6.
- [2] Liebana E, Batchelor M, Hopkins KL, et al. Longitudinal farm study of extended-spectrum β-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol* 2006;44:1630–4.
- [3] Blanc V, Mesa R, Saco M, et al. ESBL- and plasmidic class C β-lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* 2006;118:299–304.
- [4] Novais Â, Cantón R, Valverde A, et al. Dissemination and persistence of *bla*<sub>CTX-M-9</sub> are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-α, and IncFI groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2741–50.

- [5] García A, Navarro F, Miró E, Mirelis B, Campoy S, Coll P. Characterization of the highly variable region surrounding the *bla*<sub>CTX-M-9</sub> gene in non-related *Escherichia coli* from Barcelona. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:819–26.
- [6] Couturier M, Bex F, Berguist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 1988;52:375–95.
- [7] Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, et al. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β-lactams. *Emerg Infect Dis* 2006;12:145–8.

Vanessa Blanc

Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

Pilar Cortés<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Servei d'Anàlisis i d'Aplicacions Microbiològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

Raul Jesús Mesa

Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

Elisenda Miró

Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Ferran Navarro<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Montserrat Llagostera<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain

\* Corresponding author.

E-mail address: [montserrat.llagostera@uab.es](mailto:montserrat.llagostera@uab.es) (M. Llagostera)

29 May 2007

***ANEXO IV***

---

**Phylogenetic group and virulence-associated factors of ESBL- and CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from animal farms**

Vanessa Blanc<sup>1</sup>, Pilar Cortés<sup>1,2</sup>, Jesús E. Blanco<sup>3</sup>, and Montserrat Llagostera\*<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Servei d'Anàlisi i d'Aplicacions Microbiològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain.

<sup>3</sup> Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC), Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain.

<sup>4</sup> Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain.

\* Corresponding author: Dr. M. Llagostera, Edifici C, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Spain

E- mail adress: [montserrat.llagostera@uab.es](mailto:montserrat.llagostera@uab.es)

E- mail addresses:

VB: [vanessa.blanc@campus.uab.es](mailto:vanessa.blanc@campus.uab.es)

PC: [pcgarmendia@yahoo.com](mailto:pcgarmendia@yahoo.com)

JEB: [jeba@lugo.usc.es](mailto:jeba@lugo.usc.es)

MLL: [Montserrat.Llagostera@uab.es](mailto:Montserrat.Llagostera@uab.es)

## **Abstract**

### **Background**

Several studies have demonstrated that commensal *Escherichia coli* strains from humans derive from phylogenetic groups A or B1, meanwhile extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains possess specialized virulence factors and belong to phylogenetic groups B2 and D. In contrast, different results have been reported in the few works carried out with *E. coli* isolates from animals. For example, in one work, ExPEC strains isolated from retail chicken products belonged to the phylogenetic groups B2 and D but, in other, ExPEC isolates from clinical bovine and porcine derived from the phylogenetic groups A and B2. Taking in account these data, the objective of this study has been to know the phylogenetic group distribution of 106 *E. coli* strains isolated from different animal sources. Moreover, the ExPEC status of these 106 strains was determined as well as the presence of some additional virulence factors in the ExPEC strains.

### **Results**

Strains studied codify extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and CMY-2 and they were previously isolated from pig, poultry and rabbit farms in which the animals were not suspected of suffering from *E. coli* infections. Results show that most of the strains derived from phylogenetic groups A and B1, but significant differences were found as the source. Thus, most of the strains isolated from pig farms derived from phylogenetic groups A and B1 and none was ExPEC. Remarkably, although only three strains were from rabbit farms, two of them were ExPEC and derived from phylogenetic group A. This is the first time that an ExPEC strain has been identified in rabbits. Phylogenetic group D was significantly associated with strains from poultry farms. They exhibited the highest number of both ExPEC (*papA* and *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, and *KpsM II*) and non- $\beta$ -lactam resistance markers, all

were nalidixic-acid-resistant and ciprofloxacin resistance was prevalent. Most of the ExPEC strains were from poultry farms.

## **Conclusions**

The majority of *E. coli* strains that are in animal farms must be commensals because they derive from the phylogenetic groups A and B1. This seems particularly true for *E. coli* strains from pig farms. However some strains of poultry farms were apparently pathogenic, since they derive from phylogenetic groups D and B2. Moreover, ExPEC strains were identified in poultry and rabbit farms and non in pig farms. Therefore, in poultry and rabbit farms there are *E. coli* strains that are potential pathogens and this, together with the  $\beta$ -lactamases that they encode, is clearly of concern for human health.

## **Background**

*Escherichia coli* is a common inhabitant of the intestinal tract of mammals, including humans. However, several strains of this bacterium are capable of causing intestinal diseases while others, referred to as ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*), are responsible for extra-intestinal infections. Several studies involving *E. coli* isolates from humans have shown that commensal strains characteristically derive from *E. coli* phylogenetic groups A or B1 while intestinal pathogenic *E. coli* types belong to phylogenetic groups A, B1, or D. In contrast, ExPEC strains typically come from *E. coli* phylogenetic group B2 and, to a lesser extent, group D [1]. Similar results were found in a study of *E. coli* isolates from retail chicken. Most of these *E. coli* isolates were non-pathogens, but a significant minority (24%) were ExPEC, derived from *E. coli* phylogenetic groups B2 (58%) and D [2]. However, in a study that examined bovine and porcine clinical *E. coli* isolates, intestinal isolates were derived mainly

from *E. coli* phylogenetic groups A or B1 whereas ExPEC isolates belonged to phylogenetic group A and, to a lesser extent, group B2 [3].

Usually, commensal *E. coli* strains contain few virulence factors (VFs), while intestinal pathogenic strains possess distinctive VFs that are characteristic of their respective syndromes. ExPEC strains have specialized VFs that enable them to colonize host surfaces, injure host tissues, and avoid or subvert host defense systems [4]. ExPEC strains are implicated in a large range of infections in humans (neonatal meningitis, septicemia, and urinary tract infections) and in animals (urinary tract infections in cats and dogs, septicaemia in calves and pigs, and systemic colibacillosis in birds). Human ExPEC, avian pathogenic *E. coli* (APEC), and other animal ExPEC strains significantly overlap with respect to their O antigens, phylogenetic groups, and virulence genotypes [2, 5-7]. Furthermore, it has been reported that some APEC strains could belong to the same clones as human ExPEC strains [8, 9]. In addition, it is known that the resistance to antibiotics of human clinical *E. coli* isolates is associated with a decrease in the number of VFs [3, 10, 11].

We recently reported that *E. coli* strains isolated from food-producing animal farms may be a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and plasmidic class C  $\beta$ -lactamases, which have emerged as antimicrobial resistance mechanisms that are clinically relevant to humans [12]. The aim of the present study was to ascertain whether there is some relationship between different traits of these strains and the phylogenetic group from which they are derived.

## **Results and discussion**

The *E. coli* strains producing ESBLs and CMY-2  $\beta$ -lactamase were previously isolated from farms [12] in which the animals were not suspected of suffering from *E. coli* infections.

Therefore, it was hypothesized that the majority of them would be commensal strains.

Accordingly, the 106 strains analyzed by PCR for *E. coli* phylogenetic group origin (Table 1) predominantly were from phylogenetic groups A (36.8%) and B1 (31.1%). These groups mainly include commensal strains and some intestinal pathogenic *E. coli* in human isolates [1]. As expected, only 5.7% of the strains belonged to phylogenetic group B2, which includes *E. coli* strains that are highly pathogenic [13]. Nonetheless, it is noteworthy that 26.4% of the strains could be assigned to phylogenetic group D, which suggested that intestinal pathogens or ExPEC strains may be present on farms even though the animals do not show symptoms of illness.

Statistical analysis of the data show that there was a significant positive association between strains from pig farms and phylogenetic group A ( $P = 0.018$ ) and a significant negative association between these strains and phylogenetic group D ( $P = 0.049$ ). In contrast, strains derived from phylogenetic group A were significantly depleted in poultry farms ( $P = 0.007$ ). Almost all the strains of phylogenetic group B2 were found in poultry farms and significantly harbored enzymes of the CTX-M-9 group ( $P = 0.031$ ; Table 2). This shift is a consequence of the fact that enzymes of the CTX-M-9 group, especially CTX-M-14, occurred most frequently in poultry farms [12]. Likewise, the CTX-M-1 group enzymes was significantly associated with phylogenetic group A in pig farms ( $P = 0.013$ ), where the CTX-M-1 group was prevalent [12]. In addition, significant differences were found with respect to the median of non- $\beta$ -lactam resistance score. Thus, strains of phylogenetic group A ( $P = 0.001$ ) had fewer such markers than group D strains ( $P = 0.006$ ). These last strains were all resistant to nalidixic acid (NAL) and ciprofloxacin (CIP) resistance was significantly more prevalent in them.

All strains were also analyzed for the presence of five VFs (*papA/papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, and *KpsM II*), which were used to define ExPEC status. These virulence markers occurred

predominantly in strains of phylogenetic group D ( $P = 0.005$ ) and were negatively associated with phylogenetic group B1 ( $P = 0.013$ ; Table 2). Food animals, particularly from commercial poultry farms, are considered to be an important reservoir of human pathogens. Consistent with this, we found that poultry farms contained the highest percentage of strains of phylogenetic groups B2 and D. Moreover, the majority of virulence markers were detected in strains isolated from these farms ( $n = 33$ ). In them, the order of descending frequency for each VF was as follows: *iutA* (42.2%), *papC* (14.1%), *kpsM* II (12.5%), *papA* (3.1%), and *sfa/foc* (1.6%). These frequencies were similar to that reported for *E. coli* ExPEC isolates of retail poultry [2]. Virulence markers were detected in only seven strains isolated from pig farms and had the following distribution: *kpsM* II (7.7%), *iutA* (5.1%), *papA* (2.6%), and *sfa/foc* (2.6%). In strains from rabbit farms, only the allele *papC* ( $n = 1$ ), *iutA* ( $n = 1$ ), and *kpsM* II ( $n = 2$ ) were detected. The *afa/dra* marker was not present in any strain. The *papC* allele predominated in phylogenetic group B2 ( $P = 0.011$ ) and the virulence markers *iutA* and *kpsM* II in the group D ( $P = 0.013$  and  $0.038$ , respectively). The virulence markers *papC* and the *kpsM* II were negatively related to phylogenetic group B1 ( $P = 0.029$  and  $0.008$ , respectively).

As expected, the number of ExPEC strains was low (9.4%). It is noteworthy that none of these strains was isolated from pig farms ( $P = 0.003$ ), and, although only three strains were isolated from rabbit farms, the percentage of ExPEC strains was significant ( $P = 0.033$ ; Table 3). To the best of our knowledge, this the first report of ExPEC isolates from this kind of farm. Unlike previously reported data [2, 3, 13], the ExPEC strains identified in this study were significantly associated with phylogenetic group D and only one strain came from group B2. Also, the strong prevalence of the CMY-2  $\beta$ -lactamase in ExPEC strains of different serogroups should be noted ( $P < 0.001$ ).

All ExPEC strains were PCR-tested for 13 additional VFs and underwent O-antigen typing (Table 3). These strains exhibited different combinations of VFs. Colonization factors (*fimC*, *cgsA* and *crl*) were detected in all strains. The VFs *iucD* and *tsh* were detected in 90 and 80% of ExPEC strains, respectively, whereas *fyuA*, *malX*, *irp2*, *iroC*, *cvaC*, and *iss* were found in no more than four strains. In contrast, hemolysin A and avian hemolysin E were not detected in any of the strains. Three strains exhibited the O2 antigen, and all of them belonged to phylogenetic group D. Only one strain exhibited the O8 antigen. Both O antigens have been frequently identified in isolates from septicemic chickens [5]. Similarly, the O109 antigen was identified in only one strain. This O antigen, together with the O2 and O45 antigens, has been recognized in isolates from septicaemic chickens in *E. coli* strains producing chicken-lethal toxins [14]. The other O antigens that were identified consisted of O6, O15 and O25.

In human clinical *E. coli* isolates, quinolone-resistant ExPEC strains may be less virulent than susceptible isolates [3, 11, 15]. Accordingly, the only NAL-susceptible ExPEC strain identified in this work derived from phylogenetic group B2 and had the highest number of VFs. However, and in agreement with data concerning isolates obtained from retail chicken products [2], significant differences were not found between ExPEC/non-EXPEC status and either NAL or CIP resistance.

Our findings indicate that almost all the ESBL and CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from animal farms derive from the phylogenetic groups A and B1, and are, presumably, commensals. Poultry farms have a significant prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing strains, which are apparently pathogenic, since they derive from phylogenetic groups D and B2. Moreover, ExPEC strains with different O antigens were identified in poultry and rabbit farms. All of these strains are potential animal and human pathogens.

## Methods

### Bacterial strains

The study material consisted of 106 previously characterized *E. coli* strains isolated from fecal material obtained from rabbit, pig, and poultry farms [12, 16]. The *E. coli* reference strains ECOR 1 (A<sub>2</sub>), ECOR 16 (A<sub>1</sub>), ECOR 30 (B<sub>1</sub>), ECOR 39 (D<sub>1</sub>), ECOR 65 (B<sub>2</sub><sup>3</sup>), and 35a (B<sub>2</sub><sup>2</sup>) were used as positive controls for phylogenetic grouping by PCR. The following *E. coli* strains were used as positive controls for ExPEC characterization and virulence genes detection: J96 (*sfa/foc*, *papC*, *papA*, *hlyA*), CCUG31249 (*KpsM II*), FV35 (*afa/dra*), K12 (*cgsA*, *crl*), EcoR30 (*iss*, *fimC*, *iroC*), CFT073 (*irp2*, *iutA*, *tsh*, *malX*), EcoR39 (*iucD*), and EcoR16 (*fyuA*).

### Phylogenetic analysis and virulence genotyping

All strains were assigned to one of four phylogenetic groups (A, B1, B2, or D) based on the results of multiplex PCR, as previously described [17]. All strains were also screened for five virulence markers (*papA* and *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA*, and *KpsM II*). The presence of at least two of these five markers defined ExPEC status [2]. Multiplex PCR was carried out as previously described [4], with the exception that only one primer pool, with an annealing temperature of 66°C, was used. All assays were done in duplicate using independently prepared boiled lysates of each strain.

Those isolates classified as ExPEC were further analyzed by PCR for the presence of the following additional virulence factors: i) colonization factors, such as fimbriae F1 (*fimC*) [18], the curli filament structural gene (*cgsA*), the curli regulatory gene (*crl*), and temperature-sensitive hemagglutinin (*tsh*) [19]; ii) factors associated with complement resistance, such as

colicin V (*cvaC*) [20] and increased serum survival protein (*iss*) [21]; iii) iron-acquisition-related factors, such as aerobactin (*iucD*) [22], ferric yersiniabactin (*fyuA*), iron-repressible protein (*irp2*) [23], and catecholate siderophore receptor (*iroC*) [20]; iv) hemolysins such as hemolysin A (*hlyA*) [4], and the avian hemolysin E (*hlyE*) [24], and v) the marker for pathogenic island PAI I<sub>CFT073</sub> (*malX*) [4]. All assays were done in duplicate.

### **O-serotyping**

O antigen type was determined by agglutination, as described [25], employing all available O (O1-O185) antisera. All antisera were obtained and absorbed with the corresponding cross-reacting antigens to remove nonspecific agglutinins. O antisera were produced at the LREC (Lugo, Spain, <http://www.lugo.usc.es/ecoli>).

### **Statistical methods**

Comparisons of proportions were analyzed using chi-square statistics (Fisher's exact test for 2 × 2 tables). Non-parametric statistics (Mann-Whitney *U* test) were used to compare VFs and the non-β-lactam resistance scores. The significance level was fixed at 5%.

### **Authors' Contributions**

**VB** carried out the experiments and analyzed results and draft the manuscript.

**PC** contributed to the analysis and interpretation of results and helped to draft the manuscript.

**JEB** determined the O serotype of the ExPEC strains and was involved in revising the manuscript content.

**MLL** conceived the study, participated in its design and coordination and helped draft the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are deeply indebted to Dr. G. Prats for providing us with several strains. This work was partially supported by grants PI020918 (Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social de España), 2005SGR 533 (Generalitat de Catalunya) and PGIDIT065TAL26101PR (Xunta de Galicia). V. Blanc was a recipient of a predoctoral fellowship from the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain).

## References

1. Johnson JR, Russo TA: **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”**. *J Lab Clin Med* 2002, **139**:155-162.
2. Johnson JR, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE: **Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products**. *Antimicrob Agents Chemother* 2003a, **47**:2161-2168.
3. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL: **Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans**. *J Infect Dis* 2003b, **188**:759-768.
4. Johnson JR, Stell AL: **Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise**. *J Infect Dis* 2000, **181**:261-272.

5. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J: **Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity.** *J Clin Microbiol* 1997a, **11**:2953-2957.
6. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, Juárez A, Blanco J: **Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins.** *Res Microbiol* 1997b, **148**:745-755.
7. Chen YMM, Wright PJ, Lee C-S, Browning GF: **Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches.** *Vet Microbiol* 2003, **94**:57-69.
8. Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Bree A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J: **Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3484-3492.
9. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamela P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK: **The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes.** *J Bacteriol* 2007, **189**:3228-3236.

10. Johnson JR, Moseley SL, Roberts PL, Stamm WL: **Aerobactin and other virulence factor genes among strains of *Escherichia coli* causing urosepsis: Association with patient characteristics.** *Infect Immun* 1988, **56**:405-412.
  
11. Vila J, Simon K, Ruiz J, Horcajada JP, Velasco M, Barranco M, Moreno A, Mensa J: **Are Quinolone-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Less Virulent?** *J Infect Dis* 2002, **186**:1039-1042.
  
12. Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, Navarro F, Cortés P, Llagostera M: **ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms.** *Vet Microbiol* 2006, **118**:299-304.
  
13. Picard B, Sevali García J, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E: **The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.** *Infect Immun* 1999, **67**:546-553.
  
14. Truscott RB: **Studies on the chicken-lethal toxin of *Escherichia coli*.** *Can J Comp Med* 1973, **38**:160-167.
  
15. Moreno E, Prats G, Sabaté M, Pérez T, Johnson RJ, Andreu A: **Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:204-211.

16. Mesa RJ, Blanc V, Blanch AR, Cortés P, González JJ, Lavilla S, Miró E, Muniesa M, Saco M, Tórtola MT, Mirelis B, Coll P, Llagostera M, Prats G, Navarro F: **Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage).** *J Antimicrob Chemother* 2006, **58**:211-215.
17. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:4555-4558.
18. Janßen T, Schwarz C, Preikschat P, Voss M, Philipp HC, Wieler LH: **Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis.** *Int J Med Microbiol* 2001, **291**:371-378.
19. Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG: **The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*.** *Avian Dis* 1998, **42**:106-118.
20. Vandekerchove D, Vandemale F, Adriaensen C, Zaleska M, Hernalsteens JP, De Baets L, Butaye P, Van Immerseel F, Wattiau P, Laevens H, Mast J, Goddeeris B, Pasmans F: **Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks.** *Vet Microbiol* 2005, **108**:75-87.
21. Horne SM, Pfaff-McDonough SJ, Giddings CW, Nolan LK: **Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*.** *Avian Dis* 2000, **44**:179-184.

22. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O: **Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995, **12**:85-90.
23. Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heeseman J: **Prevalence of the “High-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans.** *Infect Immun* 1998, **66**:480-485.
24. Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH: **Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry.** *Vet Microbiol* 2004, **104**:91-101.
25. Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JI, González EA: **Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2.** *FEMS Microbiol Lett* 1992, **15**:155-159.

**Table 1. Phylogenetic group distribution of strains isolated from rabbit, poultry, and pig farms**

Farm	Phylogenetic group (%) <sup>a</sup>				Total number
	A (n = 39)	B1 (n = 33)	B2 (n = 6)	D (n = 28)	
Rabbit	2 (66.7)	0	0	1 (33.3)	3
Poultry	17 (26.6) <sup>(*)</sup>	21 (32.8)	5 (7.8)	21 (32.8)	64
Pig	20 (51.3) <sup>*</sup>	12 (30.8)	1 (2.6)	6 (15.4) <sup>(*)</sup>	39

<sup>a</sup> *P* value obtained from comparison of indicated group versus all others.

<sup>\*</sup>*P* < 0.05; <sup>(\*)</sup> indicates a negative association.

**Table 2. Antimicrobial resistance and virulence of the strains according to phylogenetic group**

Trait	Phylogenetic group (%) <sup>a</sup>			
	A (n = 39)	B1 (n = 33)	B2 (n = 6)	D (n = 28)
CTX-M-9 group	9 (23.1)	16 (48.5)	5 (83.3)*	11 (39.3)
CTX-M-1 group	17 (43.6)*	8 (24.2)	1 (16.7)	5 (17.9)
SHV	8 (20.5)	4 (12.1)	0	6 (21.4)
TEM	0	2 (6.1)	0	0
CMY-2	5 (12.8)	3 (9.1)	0	6 (21.4)
Median of non-β-lactam resistance score	3 (*)	5	6	5*
Nal <sup>R</sup>	23 (59.0) (*)	26 (78.8)	4 (66.7)	28 (100)*
CIP <sup>R</sup>	5 (12.8) (*)	14 (42.4)	0	15 (53.6)*
Median VF score	0	0*	1	1*
<i>papA</i>	0	1 (3)	0	2 (7.1)
<i>papC</i>	2 (5.1)	0(*)	3 (50)*	5 (17.9)
<i>sfa/foc</i>	1 (2.6)	0	0	1 (3.6)
<i>afa/dra</i>	0	0	0	0
<i>iutA</i>	9 (23.1)	7 (21.2)	1 (16.7)	13 (46.4)*
<i>kpsM II</i>	5 (12.8)	0 (*)	1 (16.7)	7 (25)*
ExPEC	3 (7.7)	0 (*)	1 (16.7)	6 (21.4)*

<sup>a</sup> *P* value obtained from comparison of indicated group versus all others.

\* *P* < 0.05; (\*) indicates negative association.

**Table 3. Virulence traits of ExPEC strains**

Farm	Strain	Antigen	Enzyme	Phylogenetic group	Virulence genotype <sup>a</sup>																		
					<i>papA</i>	<i>papC</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>KpsMII</i>	<i>iutA</i>	<i>fimC</i>	<i>cgxA</i>	<i>crl</i>	<i>tsh</i>	<i>cvaC</i>	<i>iss</i>	<i>iucD</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>iroC</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyE</i>	<i>malX</i>
Rabbit	COC002	O6	CTX-M-14	A	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	COC004	O6	CMY-2	A	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Poultry	GOC001	O2	CMY-2	D	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	GOC014	O109	CMY-2	D	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	GOC024	O25	CTX-M-32	D	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	GOC028	O2	CMY-2	D	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	GOC034	O2	CMY-2	D	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	GOC038	O25	CTX-M-9	B <sub>2</sub>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	GOC044	O15	CMY-2	D	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	GOC060	O8	CTX-M-14	A	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

<sup>a</sup> + presence; - absence