



Universitat Autònoma de Barcelona

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

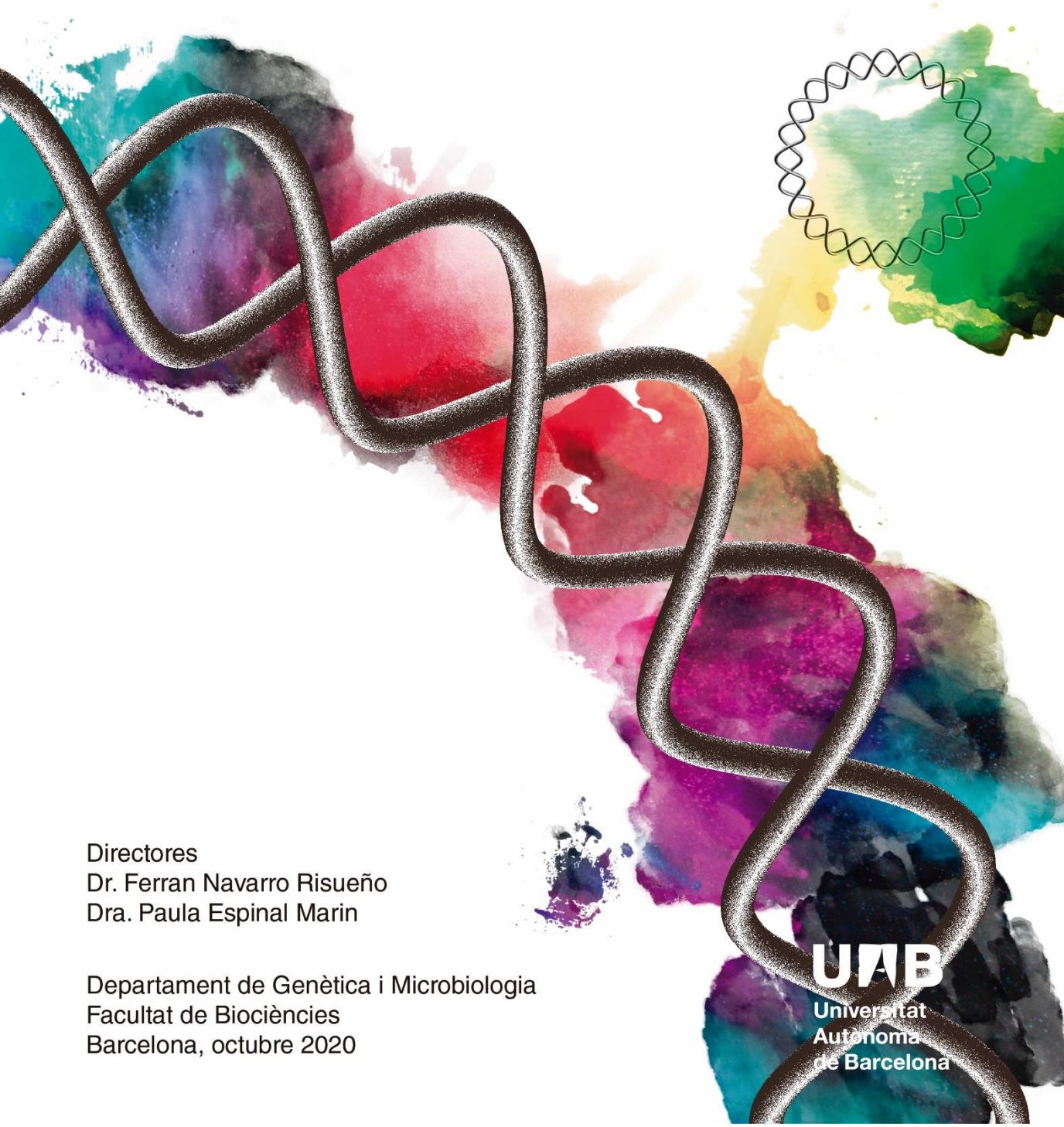
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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

Diversidad plasmídica en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*: Comparación entre aislados comensales y clínicos

Judith Rodríguez Navarro

Tesis doctoral



Directores

Dr. Ferran Navarro Risueño

Dra. Paula Espinal Marin

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

Barcelona, octubre 2020

UAB
Universitat
Autònoma
de Barcelona



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Diversidad plasmídica en cepas de *Escherichia coli*
y *Klebsiella pneumoniae*: Comparación entre
aislados comensales y clínicos**

TESIS DOCTORAL

Judith Rodríguez Navarro

DIRECTORES

Dr. Ferran Navarro

Dra. Paula Andrea Espinal

Departamento de Genética y Microbiología

Facultad de Biociencias

Barcelona, Octubre 2020



Universitat Autònoma
de Barcelona

**Diversidad plasmídica en cepas de *Escherichia coli*
y *Klebsiella pneumoniae*: Comparación entre
aislados comensales y clínicos**

Tesis doctoral, presentada por **Judith Rodríguez Navarro**, para optar al grado de doctor en Ciencias en el programa de Doctorado de Microbiología del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección de los doctores **Dr. Ferran Navarro** y **Dra. Paula Andrea Espinal** y la tutoría del **Dr. Ferran Navarro**.

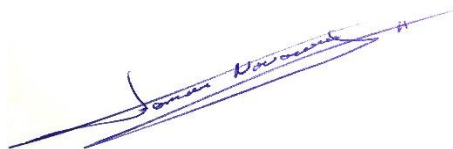
Barcelona, 2020

El **Dr. Ferran Navarro**, director del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y profesor asociado del Departamento de Genética y Microbiología de la Facultad de Biociencias de la Universitat Autònoma de Barcelona como director y tutor y, la **Dra. Paula Andrea Espinal**, investigadora postdoctoral del departamento de Microbiología de Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) en el Hospital Universitario de la Vall d'Hebron, como directora de la tesis

Certifican que:

La memoria titulada “Diversidad plasmídica en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*: Comparación entre aislados comensales y clínicos” presentada por **Judith Rodríguez Navarro** para obtener el grado de doctor en Microbiología, se ha realizado bajo su dirección y tutoría.

Para que así conste, y para los efectos oportunos firman el presente documento en Barcelona, 5 de octubre de 2020.



Dr. Ferran Navarro Risueño

Director y tutor



Dra. Paula Andrea Espinal Marín

Directora



Judith Rodríguez Navarro

Doctoranda

Ati

I have not failed. I have just found 10,000 ways that will not work

-Thomas A. Edison-

AGRADECIMIENTOS

Es curioso cómo, aun y después de escribir una tesis doctoral, estas últimas palabras pueden ser las más complicadas de expresar. Y es que han pasado ya cinco años desde el primer día que me puse esa bata blanca con el logotipo del Hospital de Sant Pau. Esa bata entre miles que llevaban todos a diario, sin ninguna distinción en particular, pero que a mí me pareció única.

Una muy buena amiga mía siempre me repite que compartir, te hace ser feliz. No sé si esto se puede aplicar al campo de la ciencia de forma estricta. Si bien es cierto que compartir el conocimiento generado en todos los ámbitos de la ciencia es uno de los principales objetivos, el término feliz es muy amplio. Pero, pensándolo bien, compartir todos estos años de doctorado, tanto con compañeros de trabajo, con amigos y familiares, ahora que he alcanzado el final de esta etapa, me llena de ORGULLO y por qué no decirlo, también de FELICIDAD. Así que sí, compartir esta larga, a veces dura, a veces hasta decepcionante, pero también muy enriquecedora, a la vez que satisfactoria y hasta quizás trepidante experiencia con todos vosotros, en este momento en el que me dispongo a poner punto final, me hace sentir increíblemente feliz.

Así que, antes de entrar en detalles con los agradecimientos, quiero agradecerle a la casualidad, al destino, al cosmos, a la suerte, al libre albedrío, a la razón, al universo, a dios, o a los dioses, o a cualquiera de las fuerzas en que cada uno quiera creer, en mi caso, a la fuerza de voluntad, empeño, constancia y, como no, al apoyo de todos mis seres queridos y allegados, por acompañarme siempre a lo largo de este camino.

Y ahora sí, primero de todo, darles las gracias a mis dos directores de tesis, el Dr. Ferran Navarro y la Dra. Paula Andrea Espinal. Al Dr. Ferran, por brindarme la oportunidad de embarcarme en esta experiencia, por confiar en mí hasta en momentos en los que yo misma dudaba, por guiarme y enseñarme que siempre hay un camino a seguir, aunque el resultado no sea el esperado. Agradecerte el tiempo que me has dedicado, aunque tu agenda sacara humo. Gracias por tenerme en cuenta, por escucharme y hacer que mi cerebro le diera vueltas a todo, por hacer que las ideas se conviertan en algo tangible. En definitiva, gracias por todo.

Y a ti Paula, la persona que me dio ese pequeño empujón que me faltaba no solo para empezar el doctorado sino también para terminarlo. Contigo he compartido todo el proceso, incluso cuando no estabas, cuando tenías que dedicarle tu tiempo al pequeño Martín o cuando tuviste que partir a Italia, siempre estuviste a mi lado. Tú me enseñaste que, para estar en consonancia con la profesión de investigador, la organización, constancia, perseverancia y paciencia eran claves. Aunque a veces te lo puse algo difícil, no desististe. A ti te doy las gracias por compartir conmigo tanto tus conocimientos como tus experiencias, por animarme a hacer la estancia, por tus consejos, sugerencias y toques de atención cuando hacían falta. Gracias por dejarme ser, a parte de tu primera doctoranda, tu amiga.

A los facultativos adjuntos del Servicio de Microbiología. Primero al anterior jefe de servicio de Microbiología el Dr. Pere Coll, quien me permitió formarme con el fabuloso grupo de investigación del Hospital de Sant Pau. También a los Doctores Alba Rivera, quien se prestó a enseñarme todo el funcionamiento de la sección de antibiogramas, Carmen Muñoz, Ferran Sánchez, Beatriz Mirelis, Núria Rabella y Núria Maragall, gracias por compartir conmigo todos vuestros conocimientos en las múltiples y largas sesiones investigadoras, por las correcciones y sugerencias de mis presentaciones orales y posters, y por los varios consejos que me habéis brindado cada uno de vosotros en distintos momentos.

A todas aquellas personas del Hospital de la Vall d'Hebron, Hospital Clínic y Universitat de Barcelona que han hecho posible el desarrollo de este proyecto multicéntrico. Al Dr. Jordi Vila, Juan Carlos Hurtado, Maite Muniesa quien, además, siempre me regalaba algún que otro consejo, con esa amabilidad que la caracteriza, en las reuniones de grupo y, por último, al Dr. Juan José González López y a todo su equipo, quienes me brindaron la oportunidad de trabajar durante un tiempo en las instalaciones de la Vall d'Hebron.

También agradecer a la Dra. Laura Piddock y Michelle Buckner del *Institute of Microbiology and Infection* de la *University of Birmingham*, quienes me acogieron con los brazos abiertos en su grupo de investigación para poder realizar mi estancia

de doctorado en una institución extranjera. Gracias a todo el grupo por la calurosa acogida, por confiar en mí, y tener la paciencia para dejar que me expresara lo mejor posible y querer entenderme.

Sobre todo, agradecer a todos mis compañeros del IR, Elisenda Miró, Montse Español, Laura Gómez, Anna Fernández, al recién incorporado Adrià Cruells, a Alba Sánchez y Marc Rubio.

Gracias Eli por ser nuestra Lab Manager nº1, por todas tus enseñanzas, correcciones y consejos. Contigo he compartido muchas risas. Para mi has sido el alma de todos los congresos que hemos compartido.

Gracias Montse, siempre dispuesta a ayudar. Que decirte..., eres la MEJOR, gran profesional y aún mejor persona, eso sí, a veces algo testaruda. Aún no me he ido y ya te echo de menos.

Laura, mi otra técnica favorita, nada se te escapa y si algo no cuadra siempre tienes una solución ingeniosa preparada o a super Montse, con la que hacéis un gran equipo. Contigo he aprendido de todo, yoga, zumba, meditación, karate, a hacer muecas con estilo, a reírme de todo y de nada, y bueno, algo de lab también. Gracias por aguantar todas mis bromas y hacer del laboratorio un sitio alegre del que poder disfrutar aun y estar entre mil bichos y muestras biológicas no siempre muy agradables.

Gracias Ana, compañera de esta experiencia que es el doctorado. Hemos compartido nuestros momentos, sobre todo para quejarnos y desahogarnos, algo que en el transcurso de un doctorado es como algo vital para poder seguir.

Gracias Adrià, el pequeñín de la casa. Breve fue el tiempo que compartimos como compis de doctorado, pero ya sabes que de mí no te vas a librar tan fácilmente; equipo COVID a tope, aunque me deis de lado por ser turno de noche (broma).

Gracias Alba, tenerte como compañera ha sido todo un privilegio. Has sido mi amiga y confidente junto con Marc. Todo ha sido mucho más ameno a vuestro lado. Hemos compartido despacho, poyata, largas conversaciones telefónicas, risas, charlas

profundas de trabajo y otras no tanto, congresos, ratos libres, salidas y un largo etcétera. A ti te voy a ir a molestar a Tarragona más de una vez y si hace falta te arrastro por esa larga melena tuya hasta Barcelona para que nos vengas a ver a Marc y a mí. Gracias por todo amiga.

Y, ya solo quedas tu Marc, pero qué te voy a decir que no sepas. Contigo lo he compartido todo, tanto los mejores como los peores momentos. Eres una de las mejores cosas, a nivel personal, que me llevo. Un gran compañero, pero sobre todo un gran amigo, al que sé que a pesar de que ya no nos veamos a diario, no voy a perder. Echare de menos todos esos momentos a media mañana y después de comer (cualquier rato que nos brindara el día en realidad), en que nos liábamos un cigarro y comprábamos un café (o al menos eso es lo que la maquina decía que era) y, entre nicotina y cafeína y alguna que otra conversación intensa, nos cargábamos las pilas mutuamente para seguir motivados hasta el final de la jornada. Muchísimas gracias Marc.

Termino agradeciéndoles a los míos su apoyo incondicional y eterna paciencia. Todos ellos creyeron siempre en mí y en que tarde o temprano este día llegaría. Han sufrido conmigo (en ocasiones, incluso más que yo) y ahora, también comparten mi alegría por ver, al fin, el final de esta etapa. A todos ellos, a mi familia, sobre todo a mis padres que, aunque todavía no tienen muy clara la diferencia entre un biólogo y un microbiólogo, nunca les supuso un problema para hablar de mi con orgullo, diciendo que su hija salvaría el mundo estudiando los bichillos de las heces. A mis abuelos, ya muy mayores, pero que siempre sacan fuerzas para apoyarme, abrazarme, sonreírme y, aun y tener ya 30 años y un trabajo, soltarme de vez en cuando cinco euros para comprarme pipas. Son adorables. A mi hermano que, en un par de días y cuatro indicaciones mías, me hizo el diseño de esta estupenda y fantástica portada. A Ceci, mi TATA, una persona que desde chiquitita siempre he admirado, y por la que ahora soy investigadora. A todos mis tíos y primos, y como no, a mis amigos.

Por último, y a riesgo de quedar cursi y perder mi reputación de chica mala, debo agradecerse todo y más al amor de mi vida. A tu Jordana, que no m'has permès ni

tan sols plantejar-me abandonar, que m'has recolzat en tot moment, que has suportat els meus canvis d'humor repentins, queixes constants y males cares. Tot i la distancia que ens ha separat durant tants anys, sempre has estat al meu costat, recolzant-me, animant-me, estimant-me. M'has ensenyat a nedar contra corrent y sempre ho he aconseguit perque sabia que tu m'agafaves de la mà.

A todos vosotros y a aquellos que quizás no he mencionado pero que, de algún modo u otro, habéis contribuido a que esto llegara a buen puerto. Muchísimas gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XIX
SUMMARY	XXV
1. Introducción	1
1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	7
1.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
1.2. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana a los antibióticos	10
1.2.1. Breve paso por la historia de los antimicrobianos	12
1.2.2. Antibióticos betalactámicos	13
1.2.3. Mecanismos de resistencia a los betalactámicos	18
1.3. Elementos genéticos móviles	29
1.4. Mecanismos de transferencia horizontal	32
1.4.1. Transformación	32
1.4.2. Transducción	33
1.4.3. Conjugación	34
1.5. Los plásmidos	35
1.5.1. Organización genética de los plásmidos	36
1.5.2. Importancia de los plásmidos en la transmisión horizontal de resistencias	41
1.5.3. Clasificación plasmídica	43
1.6. Grupos de incompatibilidad plasmídica más relevantes por su asociación con genes de resistencia antibiótica	49
1.6.1. Plásmidos IncF	50

1.6.2.	Plásmidos IncI	51
1.6.3.	Plásmidos IncN.....	52
1.6.4.	Plásmidos IncA/C	52
1.6.5.	Plásmidos IncHI.....	53
1.7.	Subtipificación plasmídica.....	55
1.7.1.	<i>Replicon sequence typing (RST)</i>	55
1.7.2.	<i>Plasmid Multilocus sequence typing (pMLST)</i>	57
1.7.3.	Double locus sequence typing (DLST)	62
2.	OBJETIVO.....	65
3.	HIPÓTESIS.....	67
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
4.1.	Muestras y ámbito de estudio	71
4.2.	Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> de muestra fecal	72
4.3.	Estudio de sensibilidad antibiótica	73
4.4.	Metodología para protocolos donde se requiere de ADN genómico	76
4.4.1.	Extracción y cuantificación de ADN genómico	76
4.4.2.	Amplificación de ADN mediante PCR.....	77
4.4.3.	Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa	82
4.4.4.	Purificación de amplicones para secuenciación	83
4.4.5.	Secuenciación por Sanger y análisis de los resultados.....	83
4.5.	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	85
4.6.	<i>Southern blot</i> e hibridación.....	87
4.7.	Análisis de la distribución de ST de IncI1 e IncN y fórmulas FAB	89
4.8.	Análisis estadístico.....	90
5.	Resultados.....	91
5.1.	Cepas del estudio.....	93
5.2.	Sensibilidad antimicrobiana y caracterización de genes <i>bla</i>	94

5.2.1.	Estudio de sensibilidad antimicrobiana mediante disco difusión...	94
5.2.2.	Portadores sanos de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas	98
5.2.3.	Caracterización de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas	99
5.3.	Identificación de plásmidos mediante PCR-based replicon typing	102
5.4.	Subtipificación de plásmidos de interés clínico	106
5.4.1.	pMLST de plásmidos IncN	106
5.4.2.	pMLST de los plásmidos Inc11	107
5.4.3.	RST de los plásmidos IncF	111
5.5.	Localización plasmídica de los genes de resistencia BLEE, AmpC y carbapenemasas	115
5.6.	Distribución de ST, fórmulas FAB y betalactamasas asociadas	123
5.6.1.	ST de plásmidos IncN	123
5.6.2.	ST de plásmidos Inc11	125
5.6.3.	FAB fórmulas de plásmidos IncF	129
5.7.	Estudio de otras características en las cepas de <i>E. coli</i>	132
5.7.1.	Grupos filogenéticos	133
5.7.2.	Factores de virulencia	136
6.	DISCUSIÓN	141
7.	CONCLUSIONES	175
8.	REFERENCIAS	181
9.	ANEXOS	203
	ANEXO I. Documento de aprobación del comité de ética y consentimiento informado para los voluntarios.....	205
	ANEXO II. Procedimientos experimentales	208
	Protocolo 1. Extracción de ADN genómico por columna (GenElute™ Bacterial Genomic DNA de Sigma-Aldrich).....	208
	Protocolo 2. Iniciadores y condiciones de PCR.....	209
	Protocolo 3. Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa	219
	Protocolo 4. Purificación de los productos de PCR	220

Protocolo 5. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	221
Protocolo 6. <i>Southern blot</i> e hibridación.....	226
ANEXO III. Alelos y RST de plásmidos IncF.....	234
ANEXO IV. Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	241

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

- Tabla 1:** Enterobacterias relevantes en microbiología clínica
- Tabla 2:** Clasificación de los principales antibióticos betalactámicos
- Tabla 3:** Clasificación funcional y molecular de las betalactamasas
- Tabla 4:** Incremento del número de betalactamasas por año

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tabla 5:** Antimicrobianos testados por disco difusión y puntos de corte según CLSI
- Tabla 6:** Genotipos cuádruples y pasos requeridos para la asignación de grupos filogenéticos
- Tabla 7:** Factores de virulencia característicos de *E. coli* patogénicas

RESULTADOS

- Tabla 8:** Cepas aisladas en cada medio de cultivo utilizado
- Tabla 9:** Procedencia de las cepas de estudio de origen clínico
- Tabla 10:** Porcentajes de resistencia en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de muestras fecales y hemocultivos
- Tabla 11:** Cepas resistentes a uno o más antimicrobianos de cada familia, cepas MDR y cepas productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas
- Tabla 12:** Genes que codifican BLEE y AmpC detectados en las cepas de *E. coli* de portadores sanos
- Tabla 13:** Genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas detectados en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivos
- Tabla 14:** Subtipificación de los plásmidos IncN
- Tabla 15:** Subtipificación de los plásmidos IncI1
- Tabla 16:** Alelos de los plásmidos IncF de nueva asignación
- Tabla 17:** Localización de los genes *bla* detectados en plásmidos
- Tabla 18:** Grupos filogenéticos detectados en las cepas de *E. coli* aisladas de muestra fecal y hemocultivo

- Tabla 19:** Frecuencia de replicones y su distribución entre los grupos filogenéticos
- Tabla 20:** Frecuencia de factores de virulencia y su distribución entre los grupos filogenéticos
- Tabla 21:** Frecuencia de factores de virulencia en presencia de los distintos replicones detectados del estudio

DISCUSIÓN

- Tabla 22:** Plásmidos descritos en asociación con alguno de los genes AmpC, BLEE y carbapenemasas del presente estudio.

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

- Figura 1:** Esquema representativo de la estructura de la membrana de bacterias gramnegativas
- Figura 2:** Unidad básica del peptidoglicano (monómero) y su entrelazamiento para la formación de la pared de peptidoglicano
- Figura 3:** Diez principales causas de defunción en 2016 según la OMS
- Figura 4:** Consumo de antibacterianos para uso sistémico en la comunidad, en países de la UE/EEE
- Figura 5:** Estructura química básica de los distintos grupos de betalactámicos
- Figura 6:** Síntesis del peptidoglicano en bacterias gramnegativas
- Figura 7:** Principales mecanismos de resistencia a betalactámicos
- Figura 8:** Distribución europea y mundial de las distintas variantes de CTX-M
- Figura 9:** Incremento en el número de betalactamasas
- Figura 10:** Aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos a nivel europeo en 2018
- Figura 11:** Representación esquemática de elementos de inserción
- Figura 12:** Organización de un integrón
- Figura 13:** Elementos genéticos móviles y procesos implicados en la movilidad intracelular o intercelular de genes de resistencia a antibióticos
- Figura 14:** Mecanismos de transferencia horizontal de genes
- Figura 15:** Ejemplo de la organización por módulos funcionales de un plásmido conjugativo
- Figura 16:** Representación esquemática por módulos del plásmido pJN24NDM1
- Figura 17:** Relación entre la clasificación de plásmidos Inc/Rep y tipo de relaxasa
- Figura 18:** Distribución de genes que codifican resistencia a diferentes clases de antimicrobianos asociados a plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad

- Figura 19:** Replicones, FIA, FIB y FII presentes en el plásmido pRSB107
- Figura 20:** Distribución de las principales formulas FAB en asociación con genes de betalactamasas
- Figura 21:** Mapa esquemático del plásmido prototipo IncI1 R64
- Figura 22:** Distribución de los principales ST de IncI1 y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos.
- Figura 23:** Principales características estructurales del plásmido IncN pNL197
- Figura 24:** Distribución de los principales ST de IncN y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos
- Figura 25:** Organización de las regiones troncales de los plásmidos IncHI1
- Figura 26:** Localización de los distintos genes utilizados para el pMLST de los plásmidos IncA/C
- Figura 27:** Distribución de los principales ST de plásmidos A/C y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos
- Figura 28:** Organización de las regiones troncales de los plásmidos IncHI2.
- Figura 29:** Distribución de los principales ST de IncHI2 y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos

MATERIAL Y MÉTODOS

- Figura 30:** Flujo de trabajo para el aislamiento e identificación de las cepas del estudio
- Figura 31:** Disposición de los discos de antibiótico en las placas de Mueller-Hinton
- Figura 32:** Componentes necesarios para el proceso de un ciclo de PCR
- Figura 33:** Replicones identificados en cada una de las 8 PCR múltiples del kit PBRT de Diatheva
- Figura 34:** Esquema del proceso de secuenciación de Sanger
- Figura 35:** Esquema simplificado del proceso de ICeul/S1-PFGE, *Southern blot* e hibridación

RESULTADOS

- Figura 36:** Perfil de sensibilidad de las cepas MDR del estudio y genes *bla* identificados
- Figura 37:** Genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasa detectados en *E. coli* y *K. pneumoniae* de ambas poblaciones en estudio
- Figura 38:** Número de replicones por cepa según el microorganismo y el tipo de muestra
- Figura 39:** Prevalencia de replicones
- Figura 40:** Distribución de los ST de plásmidos Inc11 en *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivos
- Figura 41:** Ejemplo de la localización de los replicones F (FII, FIB, FIA) en un plásmido
- Figura 42:** Distribución de fórmulas FAB detectadas con mayor frecuencia en *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivo, y las fórmulas compartidas entre poblaciones
- Figura 43:** Ejemplo de la localización de genes de resistencia BLEE y AmpC en un plásmido
- Figura 44:** Plásmidos asociados a los genes *bla* detectados en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*
- Figura 45:** Distribución de los genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de ambas poblaciones en los distintos grupos Inc
- Figura 46:** Localización de genes de resistencia *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CMY-2} en el cromosoma bacteriano
- Figura 47:** *Heat-map* de las cepas portadoras de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas de muestra fecal y hemocultivo
- Figura 48:** *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncN de *E. coli* aislados de humano
- Figura 49:** *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncN de *K. pneumoniae* aislados de humano

- Figura 50:** *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncI1 de *E. coli* aislados de humano según el país de aislamiento
- Figura 51:** *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncI1 de *E. coli* aislados de humano según la betalactamasa que portan
- Figura 52:** Fórmulas FAB más frecuentes en cepas de *E. coli* aisladas de humanos en la base de datos del pMLST
- Figura 53:** Fórmulas FAB con genes de resistencia a betalactámicos
- Figura 54:** Formulas FAB en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de humano en la base de datos del pMLST
- Figura 55:** Frecuencia de los factores de virulencia analizados en las cepas de *E. coli* de muestra fecal y de hemocultivos, y porcentajes de cepas de *E. coli* según el número de factores de virulencia que portan
- Figura 56:** Distribución de los FV de las cepas de *E. coli* en cada uno de los grupos filogenéticos

DISCUSIÓN

- Figura 57:** Prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a distintos antimicrobianos
- Figura 58:** Porcentaje de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, AmpC o carbapenemasas aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau por anualidad
- Figura 59:** Tendencia en veinte años del porcentaje de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE y enterobacterias productoras de carbapenemasas
- Figura 60:** Replicones identificados en el total de cepas en estudio
- Figura 61:** Distribución de diferentes tipos de plásmidos aislados de humanos, animales y del medio ambiente tanto en Europa, Asia como América

ABREVIATURAS

AC	Ácido clavulánico
ADC	<i>Acinetobacter-derived cephalosporinase</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Ala	Alanina
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
AmpC	Betalactamasa de clase C
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	Aztreonam
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
BrEt	Bromuro de etidio
cAmpC	AmpC cromosómica
Carb	Carbapenemasa
CAZ	Ceftazidima
CCDA	<i>Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar</i>
CEP	Cefalotina
cgPMLST	<i>core genome plasmid multilocus sequence typing</i>
CHEF	<i>Contour-clamped homogeneous electric field</i>
CIP	<i>Ciprofloxacin</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CSB	<i>Cell suspension buffer</i>
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DAP	Ácido diaminopimélico
DDD	<i>Defined daily dose</i>
DIG	Digoxigenina
DLST	<i>Double locus sequence typing</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECDC	<i>European center for disease prevention and control</i>
ECI	Elementos conjugativos integrativos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Espectro extendido
EEE	Espacio Económico Europeo
EGM	Elementos genéticos móviles
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica

EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ES	<i>EDTA</i> y <i>SLS</i>
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ETP	Ertapenem
ExPEC	<i>E. coli</i> patógeno extraintestinal
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FEP	Cefepima
FIS	Fondo de Investigaciones Sanitarias
FOX	Cefoxitina
FV	Factores de virulencia
GluNAc	N-acetil-glucosamina
Gly	Glicina
HC	Hospital Clínic
HSP	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
HVH	Hospital de la Vall d'Hebron
I	Intermedio
IMI	Imipenem
Inc	Incompatibilidad
IR	Repeticiones invertidas
ITU	Infección de tracto urinario
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MDR	<i>Multidrug-resistance</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MPF	<i>Mating pair formation</i>
MurNAc	N-acetil-murámico
NAL	Ácido nalidíxico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
O/N	<i>Overnight</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBP	<i>Penicillin binding proteins</i>
PBRT	<i>PCR-based replicon typing</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDC	<i>Pseudomonas-derived cephalosporinase</i>
PFGE	<i>Pulse Field Gel Electrophoresis</i>
PI+PZ	piperacilina-tazobactam
PIP	Piperacilina

pMLST	<i>plasmid Multilocus Sequence Typing</i>
R	Resistente
Rep	Replicón
RST	<i>Replicon sequence typing</i>
S	Sensible
SI	Secuencia de inserción
ST	Secuenciotipo
SXT	Cotrimoxazol
TE	Tris y EDTA
Tn	Transposón
Tnp	Transposasa
TZB	Tazobactam
UDP	Uridín difosfato
UE	Unión Europea
UFC	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Los plásmidos son moléculas de ADN circular extracromosómicas con capacidad de replicación autónoma. Se encuentran presentes en la mayoría de las bacterias, aportándoles una batería de genes adicionales que, en situaciones adversas, pueden ofrecer a la célula hospedadora cierta ventaja adaptativa. Se describen como principales promotores de la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel mundial, ya que se trata de elementos genéticos móviles con capacidad de adquirir y mantener multitud de genes, y con potencial para transmitirlos horizontalmente. Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, especies como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, han sido descritas como microorganismos de prioridad crítica debido a su creciente detección como bacterias multirresistentes, además de ser frecuentes agentes causales de infecciones tanto oportunistas como nosocomiales. En este contexto, las betalactamasas, enzimas responsables de la resistencia a agentes betalactámicos, constituyen uno de los mecanismos de resistencia más difundidos a través de elementos genéticos móviles, como los plásmidos, en esta familia bacteriana.

A pesar del extenso conocimiento existente acerca de los plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica de aislamientos causantes de infección, el estudio de plásmidos presentes comúnmente en la microbiota comensal es más limitado. Es por esto que, mediante el estudio y comparación del contenido plasmídico en la microbiota comensal de individuos sanos y de pacientes, el objetivo del presente estudio fue determinar las diferencias o similitudes de estos plásmidos entre ambas poblaciones independientemente de su carácter resistente o sensible, con el fin de inferir en su origen y evolución en las cepas causantes de infección.

Para ello, se aislaron cepas de *E. coli* (n=244) y *K. pneumoniae* (n=115) de 150 muestras fecales de individuos sanos y de 202 pacientes con bacteriemia. Se realizó un estudio de sensibilidad a antimicrobianos mediante disco difusión, se identificaron las cepas multirresistentes siguiendo los criterios de Magiorakos *et al.*, y se caracterizó, por PCR y secuenciación, los genes codificantes de BLEE, AmpC y carbapenemasas. El estudio de plásmidos se realizó utilizando la técnica de PBRT y, una vez conocido el contenido plasmídico, se subtipificaron los plásmidos IncF, Inc11

e IncN mediante pMLST para diferenciar cada uno de ellos dentro de un mismo grupo de incompatibilidad. La localización de los genes que codifican para BLEE, AmpC y carbapenemasas, al igual que la definición de la fórmula FAB de los plásmidos IncF, se realizó mediante la técnica de *Southern blot* e hibridación. Por último, se identificaron los grupos filogenéticos y factores de virulencia de *E. coli* por PCR.

El antibiograma mostró un porcentaje de resistencia significativamente superior en las cepas de muestra clínica que en las de individuos sanos. Un 29,2% de las cepas de muestra clínica frente a un 10,8% en individuos sanos resultaron multirresistentes y, de estas, el 61% y 76,5%, respectivamente, eran portadoras de genes codificantes de BLEE, AmpC o carbapenemasas. La prevalencia de cepas de *E. coli* clínicas productoras de BLEE fue de 17,2% (SHV, CTX-M) y 5% de AmpC (CMY, DHA); en *K. pneumoniae*, un 16,5% fueron productoras de BLEE (SHV, CTX-M), un 1% de AmpC (DHA), y un 1,9% de carbapenemasas (KPC). Por otro lado, se observó una prevalencia del 4,7% de portadores sanos de *E. coli* productoras de BLEE (SHV, CTX-M) y un 2,7% de AmpC (CMY). Comparado con estudios de años anteriores, ambas poblaciones han sufrido un aumento en la detección de cepas productoras de estas enzimas siendo también, en ambos casos, la CTX-M-15 y la CMY-2 las betalactamasas más frecuentes.

Los resultados del PBRT mostraron como el contenido plasmídico de ambas poblaciones seguía una misma tendencia sin diferencias significativas destacables. La excepción se observó en los replicones L, M, A/C y N, los cuales solo se detectaron en las cepas de muestra clínica. Además, algunos de estos plásmidos con replicón L o N fueron detectados en asociación a genes *bla*_{BLEE}. Los replicones detectados con mayor frecuencia en ambas poblaciones de *E. coli* fueron, ColE, los de la familia F, los I1 y los X1; de igual modo, en las cepas de *K. pneumoniae*, ColE, los F, I1 y, en este caso, los R, fueron los más frecuentes. En general, la media de replicones (y por extensión, posiblemente de plásmidos) por cepa, es superior en *E. coli* que en *K. pneumoniae*. En ambas especies, el número de cepas con ningún o un replicón es mayor en individuos sanos que en pacientes y, el porcentaje se invierte cuanto más grande es el número de replicones.

La subtipificación de alguna de las familias plasmídicas, nos permitió observar cómo dentro de un mismo grupo de incompatibilidad existe una gran diversidad de secuenciotipos. Dentro de los plásmidos IncI1 se observó una gran diferencia entre los ST identificados en las cepas, tanto de *E. coli* como *K. pneumoniae*, de individuos sanos y pacientes. Solo los ST12 y ST36 se identificaron en ambas poblaciones de *E. coli*, con la peculiaridad de que todos los ST12 se encontraron en asociación con el gen *bla*_{CMY-2}. Por el contrario, a pesar de que también se detectó una gran diversidad de RST (fórmulas FAB) dentro de los plásmidos IncF, aquellos detectados con mayor frecuencia, estuvieron presentes en ambas poblaciones y, no se identificó ninguna fórmula FAB destacable por su asociación a genes *bla*.

Por último, se observó como las cepas de individuos sanos mostraron porcentajes inferiores de resistencia a los antimicrobianos y menos FV que en las cepas de pacientes. Además, presentaron mayor diversidad de linajes filogenéticos que las cepas causantes de infección. Por otro lado, a pesar de que hasta el momento no se ha descrito ninguna asociación evidente entre el grupo filogenético de la cepa y su contenido plasmídico nuestros resultados indicaron una posible asociación entre los plásmidos IncHI1 y el grupo A, además de observarse una relación significativa entre algunos de los factores de virulencia y las cepas hospedadoras de plásmidos IncF.

Finalmente, se pudo concluir que, el contenido plasmídico en la población de cepas clínicas es un reflejo del contenido en cepas de individuos sanos, pero hay ciertos plásmidos que, tanto en el presente estudio como en otros, se han visto asociados, en su gran mayoría, a genes de resistencia a antimicrobianos. Además, estos plásmidos han sido detectados solo, o mayoritariamente, en cepas causantes de infección, sugiriendo una mejor adaptación a ambientes sometidos a presión selectiva que les permite una mayor difusión. También se ha observado la presencia de secuenciotipos IncI1 como el ST12 que, según los resultados obtenidos y lo descrito en la literatura, pueden ser considerados plásmidos epidémicos, encontrándose asociados al gen *bla*_{CMY-2} en ambas poblaciones. En cambio, los plásmidos IncF parecen haber cogido una vía evolutiva contraria a los IncI1, es decir que, estos plásmidos han adquirido distintos genes de resistencia a antimicrobianos

de forma aleatoria, sin ningún RST destacable por ello. Por lo tanto, toda la familia de plásmidos IncF es potencialmente susceptible a adquirir y diseminar genes de resistencia.

SUMMARY

Plasmids are extrachromosomal circular DNA molecules that can replicate autonomously. They are found in most bacteria, conferring them a range of additional genes which, in unfavourable situations, can provide the host cell with certain adaptative advantages. They are globally described as primary promoters for the dissemination of antimicrobial resistance genes, as they are mobile genetic elements and have the capability of acquiring and keeping lots of genes and potentially transmitting them horizontally. Within the *Enterobacteriaceae* family, species such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* have been described as critical propriety microorganisms due to their increasing detection as multiresistant bacteria. Moreover, they are pathogens frequently causing opportunistic and nosocomial infections. Given this situation, beta-lactamases, enzymes that provide resistance to beta-lactamic agents, constitute one of the most disseminated resistance-providing mechanisms through mobile genetic elements, such as plasmids, within enterobacteria.

Despite the broad existing knowledge on plasmids carrying antibiotic-resistant genes from isolates causing infection, the study of plasmids often present in the commensal microbiota is quite limited. Due to this reason, through the study and comparison of the plasmid content in the commensal microbiota from healthy individuals and patients with bacteremia, the main aim was to determine the differences and similarities of the plasmid content between these two populations independently of their susceptibility or resistant nature, with the purpose to shed light on the origin and evolution of infection-causing bacteria.

To achieve that goal, *E. coli* (n=244) and *K. pneumoniae* (n=115) strains from 150 faecal samples from healthy individuals and 202 patients with bacteraemia were isolated. An antimicrobial susceptibility testing was performed through the disc diffusion technique, the multiresistant strains were identified following the Magiorakos *et al.* criteria, and the *bla*_{ESBL}, *bla*_{AmpC} and *bla*_{carbapenemase} genes were characterised by PCR and sequencing approaches. The plasmid study was performed by using the PBRT technique. Plasmids IncF, IncI1 and IncN, were subtyped by pMLST, in order to differentiate each of them within the same incompatibility group. The

location of the genes that encode ESBL, AmpC and carbapenemases, was performed by using the Southern blot and hybridisation techniques. The same methodology was used to generate the FAB formula of the IncF plasmids. Finally, the phylogenetic groups and the virulence factors of *E. coli* were identified by PCR.

The antimicrobial susceptibility testing showed resistance rates significantly higher in strains from clinical samples, than the ones from healthy individuals. From the clinical samples, 29.2% of the strains turned out to be multiresistant against 10.8% from healthy individuals. Within these percentages, 61% and 76.5%, respectively, were carriers of genes encoding ESBL, AmpC or carbapenemases. The prevalence of clinical ESBL-producing and AmpC-producing *E. coli* strains was 17.2% (SHV, CTX-M) and 5% (DHA), respectively. In *K. pneumoniae*, 16.5% of the strains were ESBL-producers (SHV, CTX-M), 1% were AmpC-producers (DHA) and 1.9% were carbapenemase-producers (KPC). Furthermore, 4.7% of the healthy individuals were carriers of ESBL-producing *E. coli* (SHV, CTX-M) and 2.7% were carriers of AmpC-producing *E. coli*. Comparing these observations with studies performed in previous years, both populations have suffered an increased detection of strains that produce those enzymes and, in both cases, the beta-lactamases CTX-M-15 and CMY-2 were the most frequent.

The results from the PBRT analysis showed how the plasmid content in both populations kept the same trend without significant differences. The exception was observed in the replicons L, M, A/C and N, which were only detected in strains from clinical samples. What is more, some of these plasmids with a replicon L or N were detected in association with *bla*_{ESBL} genes. ColE, F family, I1 and X1 were the most frequently detected replicons in both populations of *E. coli*. Similarly, ColE, the ones from the F family, I1 and R were the most frequently detected replicons within the *K. pneumoniae* strains. In general, the average of replicons (and probably plasmids) per strain was higher in *E. coli* than in *K. pneumoniae*. In both species, the number of strains with one or without replicons was higher in healthy individuals than in patients. Nevertheless, the higher the number of replicons, the more those percentages get inverted.

The subtyping of some of the plasmid families allowed us to observe a great diversity of sequence types (ST) within the same group of incompatibility. Within the plasmids IncI1, we observed a huge difference between the identified ST in *E. coli* and *K. pneumoniae* from healthy individuals, in comparison with the ones from patients. Only ST12 and ST36 were identified in both populations of *E. coli*. Noticeably, all the ST12 were found in association with the *bla*_{CMY-2} gene. In contrast, even though a great diversity of RSTs (FAB formulas) was detected within the IncF plasmids, those detected at higher rates were present in both populations. Furthermore, no formula was distinguishable by its association with *bla* genes.

Finally, it was observed that the strains from healthy individuals presented lower antimicrobial resistance rates and less virulence factors than the strains from patients. Furthermore, they were associated with a wider diversity of phylogenetic lineages than the strains causing infection. On the other hand, despite currently there is no evident association described between the phylogroup of the strain and its plasmid content, our results indicated a possible association between the IncHI1 plasmids and group A. Additionally, we observed a significant relationship between virulence factors and the strains who carried on IncF plasmids.

In conclusion, the plasmid content in the populations belonging to the clinical strains mirrors the plasmid content from healthy individual strains. Nevertheless, and in agreement with other studies, there are certain plasmids in the present study that have been mainly associated with antimicrobial-resistance genes. In addition, these plasmids have been only detected in infection-causing strains, suggesting a better adaptation to an environment subjected to selection pressures, allowing them to a grater diffusion. The presence of Inc1 ST, such as ST12, has also been observed and can be considered as epidemic plasmids being in association to the *bla*_{CMY-2} gene, in all cases. On the other hand, the IncF plasmids seem to have evolved differently from the Inc1 plasmids. Thus, these plasmids have acquired multiple antimicrobial resistance genes randomly, with no evidence that the persistence of a single IncF is responsible for their dissemination. Therefore, the entire IncF family of plasmids is potentially capable of to acquiring and propagating resistance genes.

1. Introducción

A decorative graphic featuring a blue DNA double helix structure. The helix is integrated into the text 'Introducción', with the 'o's in 'Introducción' being replaced by circular DNA segments. A solid blue line curves around the text, and a dashed blue line forms a larger loop around it.

1.1. Familia *Enterobacteriaceae*

En 1939 el microbiólogo Otto Rahn denominó familia *Enterobacteriaceae* a todo un conjunto de microorganismos cuyas características bioquímicas y morfológicas eran similares.

Hasta el 2016, la familia *Enterobacteriaceae* ha sido la única representante del orden de los Enterobacteriales. Esta familia comprendía más de 60 géneros y alrededor de 250 especies descritas¹. Gracias a la rápida evolución y creciente accesibilidad a las técnicas de secuenciación genómica, se dispone de mucha más información para inferir, de forma confiable, sobre las relaciones evolutivas dentro del orden Enterobacteriales. Así, recientes análisis filogenómicos y genómicos comparativos de los miembros de este orden han llevado a su división en siete familias distintas, además de un cambio en la denominación del orden de Enterobacteriales a Enterobacterales². Aun así, la familia *Enterobacteriaceae* sigue siendo la más grande dentro de este orden, formado por 28 géneros y más de 75 especies distintas¹.

La familia *Enterobacteriaceae* se compone por un grupo grande y diverso de bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas y con movilidad flagelar peritrica, a excepción de los géneros *Shigella* y *Klebsiella*. Metabólicamente, se caracterizan por fermentar la glucosa y reducir los nitritos a nitratos. Además, son oxidasa negativos, a excepción de *Plesiomonas*, y catalasa positivos, a excepción de *Shigella dysenteriae*^{3,4}. Como bacterias gramnegativas, presentan una envoltura celular que se caracteriza por una estructura multilaminar compuesta por³ (Fig. 1):

- Membrana externa: bicapa lipídica que incluye, fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas (unen membrana externa con el peptidoglucano), porinas multiméricas (permiten el paso selectivo de sustancias hidrofílicas) y otras proteínas. El LPS contiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A (parte biológicamente activa que actúa como endotoxina), el oligosacárido fosforilado central (*core*) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición (antígeno O, el cual es básico para la clasificación por serogrupos).

- Membrana interna o citoplasmática: doble capa fosfolipídica que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas; además presenta proteínas de membrana involucradas en la producción de energía, biosíntesis de lípidos y secreción de proteínas.
- Espacio periplasmático: compartimento celular acuoso delimitado por las membranas interna y externa, con una elevada concentración proteica y una fina capa de peptidoglicano.

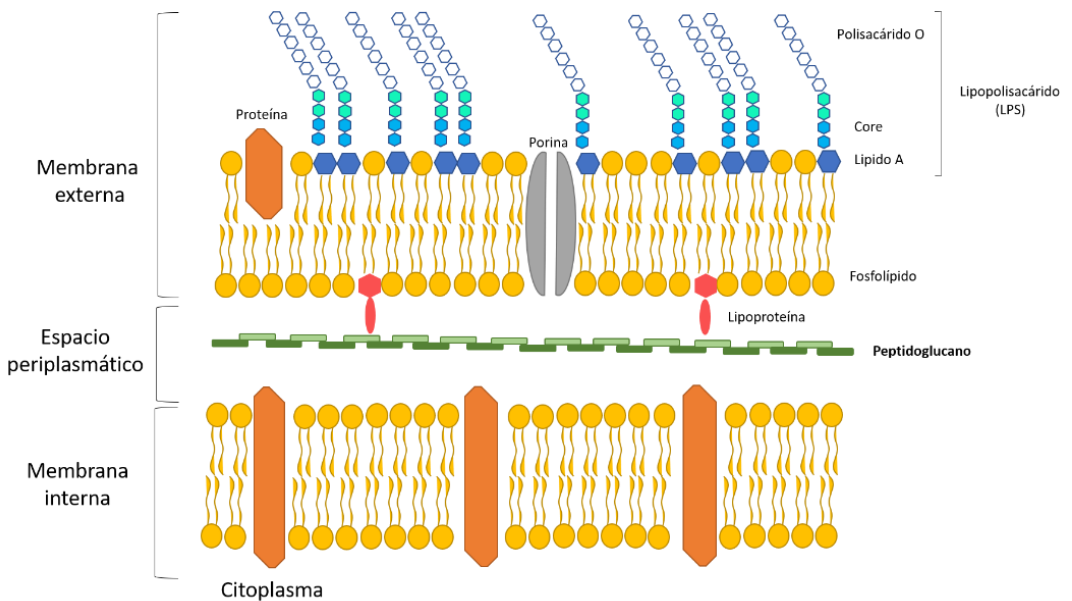


Figura 1. Esquema representativo de la estructura de la membrana de bacterias gramnegativasⁱ.

Peptidoglicano: El peptidoglicano, también llamado mureína, es un heteropolímero que consiste en cadenas lineares entrelazadas de monómeros de peptidoglicano. Un monómero de peptidoglicano consta de dos amino azúcares, N-acetil-glucosamina (GluNAc) y ácido N-acetil-murámico (MurNAc), unidos mediante enlaces β -1,4. Unida al ácido MurNAc, encontramos una cadena lateral generalmente compuesta de cuatro aminoácidos: L-alanina, D-glutámico, ácido meso-diaminopimélico (DPA) y

ⁱ Imagen elaborada en el presente estudio

D-alanina, donde D-alanina se une a la DPA del siguiente monómero. Dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento, una fracción de péptidos puede contener Gly en vez de D-Ala, al igual que puede contener distintos porcentajes de penta, tetra, tri o dipéptidos. En *E. coli*, por ejemplo, el porcentaje de pentapéptidos es muy bajo debido a su rápida degradación proteolítica. Así pues, el ácido MurNAc, GluNAc y el tetrapéptido forman la unidad básica del peptidoglicano, unidad que se entrelaza con otras a través de enlaces covalentes formando una malla polimérica estable y rígida para preservar la integridad celular⁵⁻⁷ (Fig. 2).

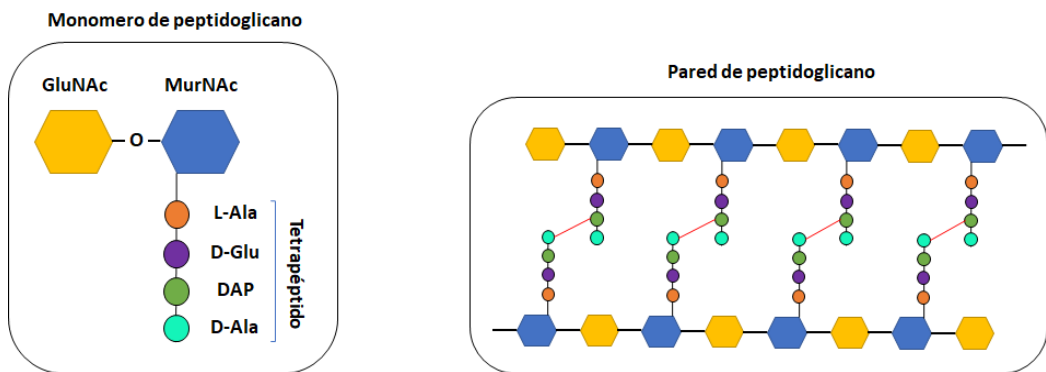


Figura 2. Unidad básica del peptidoglicano (monómero) y su entrelazamiento para la formación de la pared de peptidoglicanoⁱⁱ.

Entre las proteínas de membrana existen algunas organelas complejas que se extienden hacia el exterior:

- Flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna.
- Fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales o conjugativos, que median la transferencia conjugativa de ADN.

ⁱⁱ Imagen elaborada en el presente estudio

La familia *Enterobacteriaceae*, también denominadas comúnmente como enterobacterias, reciben su nombre por su localización habitual como saprofitos en el tracto intestinal de muchos animales, además del hombre; aunque se trata de bacterias ubicuas, encontradas de forma universal en diversos ambientes como el suelo, el agua y la vegetación⁴.

Algunos de los miembros de esta familia son de relevancia clínica debido a su capacidad de causar infección primaria, tanto en individuos comprometidos como en individuos sanos. Mientras que otros miembros considerados comensales, son causantes de múltiples infecciones oportunistas (Tabla 1).

En febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de “patógenos prioritarios” que, debido a sus resistencias crecientes a múltiples antimicrobianos, componen el grupo de bacterias más peligrosas para la salud humana. Esta lista se divide en, prioridad crítica, alta o media, según la urgencia actual en el desarrollo de nuevos fármacos para combatirlos. Dentro de la categoría de prioridad crítica, encontramos aquellas bacterias multirresistentes especialmente peligrosas en ámbitos clínicos que, entre otras, incluyen enterobacterias tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*⁸.

Tabla 1. Enterobacterias relevantes en microbiología clínica

GENERO	ESPECIE	PATOLOGÍA
Patógeno		Infección primaria
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i> Serotipos: Enteritidis, Typhimurium, otros Serotipos: Typhy, Paratyphi A, B, C	Enteritis Fiebre tifoidea, paratifoidea
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae, S. sonnei, S. flexneri, S. boydii</i>	Enteritis
<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Peste Enteritis Adenitis mesentérica
<i>Klebsiella</i>	<i>K. granulomatis</i> <i>K. rhinoscleromatis</i> <i>K. ozaenae</i>	Granuloma inguinal Rinoscleroma Ocena
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Enteritis
Comensales		Infección oportunista
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Infección de tracto urinario (ITU), peritonitis, diverticulitis, abscesos viscerales, neumonía, meningitis, osteomielitis, artritis, sepsis
<i>Klebsiella</i>	<i>k. pneumoniae</i>	Neumonía, ITU, sepsis
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae, E. aerogenes</i>	ITU, infecciones de torrente circulatorio, respiratorias, de herida quirúrgica, de quemaduras, endocarditis, artritis séptica y osteomielitis
<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>	Meningitis, ITU, sepsis
<i>Proteus</i>	<i>P. vulgaris, P. mirabilis</i>	Infección de herida, ITU, meningitis
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>	Sepsis, absceso, corioamnionitis, celulitis
<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i>	ITU
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii, C. koseri</i>	Infecciones respiratorias, de herida, ITU, meningitis, sepsis

* Información extraída⁹⁻¹⁴ de Baron *et al.* 1996, Price *et al.* 2017, Martin *et al.* 2018, Khanna *et al.* 2013, Liu *et al.* 2016, Rózalski *et al.* 2012.

1.1.1. *Escherichia coli*

Es una de las especies bacterianas más conocidas y uno de los aislamientos más comunes en los laboratorios de microbiología clínica. La mayoría de *Escherichia coli*

se caracterizan por fermentar la lactosa y producir indol a partir del triptófano. Las cepas biológicamente importantes para los seres humanos pueden clasificarse de forma genérica, según criterios genéticos y clínicos, en¹⁵⁻¹⁸:

- Cepas comensales: constituyen la mayor parte de la microbiota intestinal facultativa de seres humanos sanos, otros mamíferos y aves.
- Cepas patógenas intestinales: en general pueden causar gastroenteritis o colitis con mayor o menor gravedad según el patotipo de *E. coli* y otras características dependientes del estado del huésped. Se clasifican en seis categorías distintas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).
- Cepas patógenas extraintestinales (ExPEC): Pueden causar infecciones del tracto urinario, meningitis, infecciones intraabdominales, neumonía, osteomielitis e infecciones de tejidos blandos. Además, cualquiera de las infecciones anteriores puede derivar en bacteriemia.

El carácter patogénico de ciertas *E. coli* es conferido por la combinación de diversos factores de virulencia (FV) que favorecen el desarrollo e invasión del huésped, la evasión del sistema inmunológico y, por consecuencia, el desarrollo de una infección. Algunos de estos FV son adhesinas, cápsulas, quelantes del hierro, hemolisinas, toxinas y sideróforos^{17,18}.

Teniendo en cuenta la gran diversidad dentro de esta especie bacteriana, pudiendo actuar como microorganismo comensal o causante de patología, se han desarrollado múltiples estudios filogenéticos con el propósito de determinar su evolución genómica además de revelar el origen de su patogenicidad^{19,20}. Entre ellos, la clasificación de *E. coli* mediante grupos filogenéticos. Actualmente, existen ocho grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F y clado I, según la última descripción de Clermont *et al.*²¹. El grupo filogenético A se describe como el predominante en la microbiota comensal humana²²⁻²⁴, aunque existen fluctuaciones en la distribución de los grupos filogenéticos según las diferencias morfológicas, fisiológicas y

dietéticas que ocurren entre humanos de diferente género, edades o regiones geográficas, así como de la especie hospedadora²². Por otro lado, se ha visto que los grupos filogenéticos predominantes en cepas patógenas pertenecen a los grupos B2 y D¹⁶. Además, estas cepas presentan un mayor número de factores de virulencia que las cepas comensales¹⁶.

1.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, se caracteriza por su capacidad de fermentar la lactosa formando colonias rosadas en agar MacConkey. Son negativas en la prueba del indol.

K. pneumoniae es una bacteria que reside en el medio ambiente, tanto en suelos como en aguas superficiales y, además, es capaz de colonizar las superficies de la mucosa humana, como el tracto gastrointestinal y la orofaringe de forma comensal. Desde estos sitios, las cepas de *K. pneumoniae* pueden invadir otros tejidos y causar infecciones graves en humanos. Se trata de la especie de mayor relevancia clínica dentro de su género, cuyo éxito reside en su capacidad de evadir y sobrevivir al sistema inmunológico, más que en suprimirlo de forma activa²⁵. Es capaz de causar infección del tracto urinario y neumonía en personas sanas, pero lo habitual es que genere infección oportunista de origen nosocomial. Clásicamente, *K. pneumoniae* se asocia a la neumonía lobar, de carácter necrotizante, pero también es causante de infecciones de tejido blando y de herida quirúrgica. Ocupa el segundo lugar, después de *E. coli*, en la incidencia como causa de infecciones invasivas como bacteriemia por gramnegativos y, además, también se detecta de forma frecuente en infecciones del tracto urinario, después de *E. coli* y *Proteus mirabilis*²⁶.

Los factores de virulencia más estudiados en *K. pneumoniae* son aquellos relacionados con la cápsula, los polisacáridos, sideróforos y fimbrias. La mayoría producen colonias sumamente mucoides en medio sólido debido a la producción de estas cápsulas de polisacárido (antígeno K). Este carácter mucoide es el factor de virulencia más conocido, y les confiere capacidad de evasión del sistema inmune

durante la infección y una mayor eficiencia en la generación de biofilm. Sin embargo, existe una gran heterogeneidad en las cepas de *K. pneumoniae*, y no todos los factores de virulencia desempeñan el mismo papel crítico en todas las cepas de *K. pneumoniae*, ni tampoco juegan el mismo papel en los diferentes tipos de infección^{25,27,28}.

1.2. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana a los antibióticos

Uno de los principales motivos por los cuales las infecciones causadas por estos microorganismos representan un problema crítico en la clínica, es su capacidad de generar y adquirir mecanismos de resistencia a los distintos antimicrobianos usados para combatirlos.

Los mecanismos moleculares de resistencia a los antimicrobianos se dividen genéticamente en dos categorías: resistencia intrínseca o natural, y resistencia adquirida. Esta primera hace referencia a aquellas situaciones en que una especie o género bacteriano no se ve afectado por ciertos antibióticos debido a propiedades fisiológicas fundamentales inherentes de cada grupo bacteriano. Por otro lado, la resistencia adquirida hace referencia a aquellas situaciones donde una bacteria que solía ser sensible a determinada concentración de un antibiótico deja de serlo^{29,30}.

a) Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca, es la capacidad innata de una especie bacteriana de resistir a la actividad de un agente antimicrobiano en particular, a través de características estructurales y funcionales inherentes. Esta tolerancia puede deberse a:

- Baja afinidad del antimicrobiano por la diana bacteriana o directamente ausencia de esta diana.
- Inaccesibilidad del antimicrobiano a la diana.
- Expulsión del fármaco del interior celular por exportadores activos de codificación cromosómica.

- Presencia constitutiva de otros mecanismos de resistencia.

Así, algunos ejemplos de resistencia intrínseca incluyen, la falta de acción de la vancomicina por la incapacidad de esta para penetrar la membrana externa de bacterias gramnegativas; la producción cromosómica de betalactamasas (SHV-1) en especies de *Klebsiella*, que hidrolizan la ampicilina antes de que esta llegue a la diana (PBP) proporcionándoles resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas; o la AmpC cromosómica inducible de *Enterobacter*³¹⁻³³.

b) Resistencia adquirida

La resistencia adquirida puede darse, o bien por mutaciones puntuales en el cromosoma bacteriano como consecuencia de errores en el momento de la replicación o reparación del ADN, por deleciones, inserciones y duplicaciones, o por la adquisición de material genético exógeno³². En este último caso, la adquisición de genes de resistencia exógenos se lleva a cabo a través de tres procesos: transformación, transducción o conjugación (detallados en el punto 1.4). La adquisición de genes por cualquiera de estos tres mecanismos mencionados, se denomina transferencia horizontal de genes, mientras que la difusión de genes entre generaciones (de célula madre a hija) se denomina transferencia vertical³¹.

Tanto los cambios en el genoma bacteriano por mutaciones como por adquisición horizontal de genes, contribuyen a la variabilidad genética y a la evolución bacteriana permitiéndoles adaptarse y sobrevivir a cambios en el ambiente³⁴.

La resistencia adquirida, tiene importantes implicaciones clínicas debido a que la aparición de resistencias hace que los tratamientos previamente efectivos sean terapéuticamente inútiles^{29,30}.

1.2.1. Breve paso por la historia de los antimicrobianos

Durante mucho tiempo, las infecciones han representado la primera causa de muerte en humanos. A pesar de que a lo largo de la historia ha habido una intensa lucha para combatir las infecciones y las resistencias de estos microorganismos, actualmente, las infecciones (sobre todo de vías respiratorias, gastrointestinales y tuberculosis) siguen estando entre las 10 principales causas de defunción³⁵ (Fig. 3).

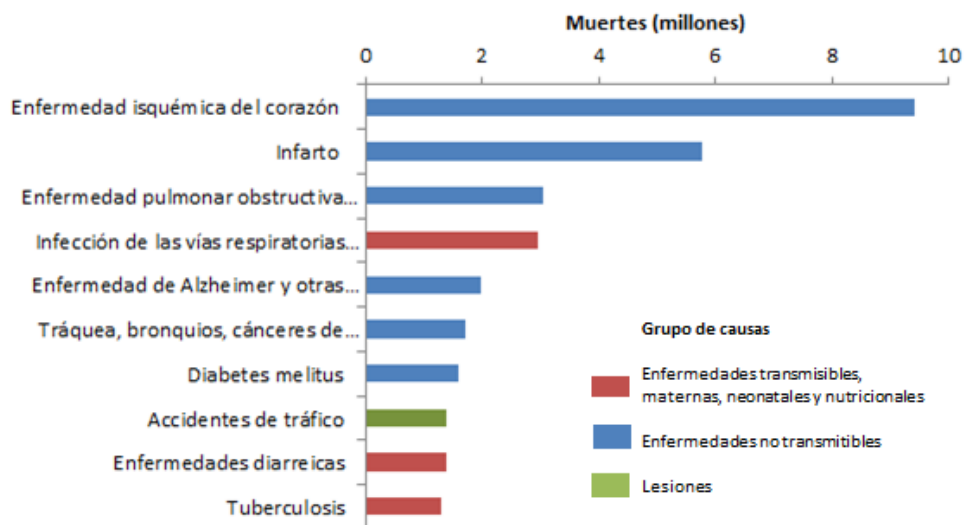


Figura 3. Diez principales causas de defunción en 2016 según la OMS. Estimaciones de Salud Global: Muertes por causa, edad, sexo, país y región. Ginebra, OMS. Imagen adaptada de la OMS³⁵.

No fue hasta finales del siglo XIX cuando Robert Koch y Louis Pasteur empezaron a correlacionar la existencia de patógenos microscópicos con el desarrollo de diversas enfermedades³⁶. En 1928, Alexander Fleming descubrió uno de los hallazgos que revolucionaría el mundo de la medicina, de tal forma, que reduciría la tasa de mortalidad por infecciones de forma drástica. El descubrimiento de la Penicillina G (*Penicillium notatum*) y su introducción en 1943 solo fue el inicio de los siguientes 20 años de la era de oro de los antimicrobianos. En 1944, se aisló la estreptomicina de *Streptomyces griseus*, y en 1952 la vancomicina de *Streptomyces orientalis*, entre otros antimicrobianos como aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclina y

macrólidos³⁷⁻³⁹. Sin embargo, en pocos años, la aparición de resistencias a estos agentes antimicrobianos se empezó a hacer evidente. En 1940, Abraham y Chain detectaron la presencia de una enzima que inactivaba la acción de la penicilina⁴⁰, y en 1944, se describió la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina G debido a la producción de penicilinasas⁴¹. Fue entonces cuando se empezaron a buscar nuevas formas de mejorar los agentes antimicrobianos ya existentes para combatir este obstáculo. En 1956, se desarrolló la meticilina, primera penicilina semisintética capaz de resistir la hidrólisis de la penicilinasas; además, el espectro de actividad y farmacocinética de la penicilina mejoró con la introducción de la ampicilina en 1961. Las cefalosporinas comenzaron a surgir en la década de los 60 y su evolución las dividió en cuatro generaciones (cinco actualmente) según su espectro de actividad³⁶. En 1976, se identificaron por primera vez los inhibidores de la betalactamasa. De éstos, se derivó el ácido clavulánico y la tienamicina, que se convirtió en el precursor de los carbapenems⁴².

1.2.2. Antibióticos betalactámicos

Después de más de 80 años desde su descubrimiento, los betalactámicos siguen constituyendo la familia de antimicrobianos más numerosa y utilizada en la práctica clínica. Presentan acción bactericida lenta, escasa toxicidad, alta eficiencia y un amplio espectro de acción. Sin embargo, el incremento de resistencias frente a estos antimicrobianos en las últimas dos décadas se ha convertido en un problema de salud pública⁴³⁻⁴⁵.

Según el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC por sus siglas en inglés, *European center for disease prevention and control*), en 2017 el consumo medio en EU/EEA de antimicrobianos para uso sistémico (tanto en la comunidad ($\approx 90\%$) como en el sector hospitalario ($\approx 10\%$)), fue de 23,4 DDD (dosis diaria definida del inglés *defined daily dose*) por 1000 habitantes por día, con un rango de 11 en los Países Bajos a 34,1 en España⁴⁶ (Fig. 4). Además, como se muestra

en la Figura 4B, los beta lactámicos (azul claro y oscuro), son los antimicrobianos de mayor consumo en todos los países de la EU/EEA.

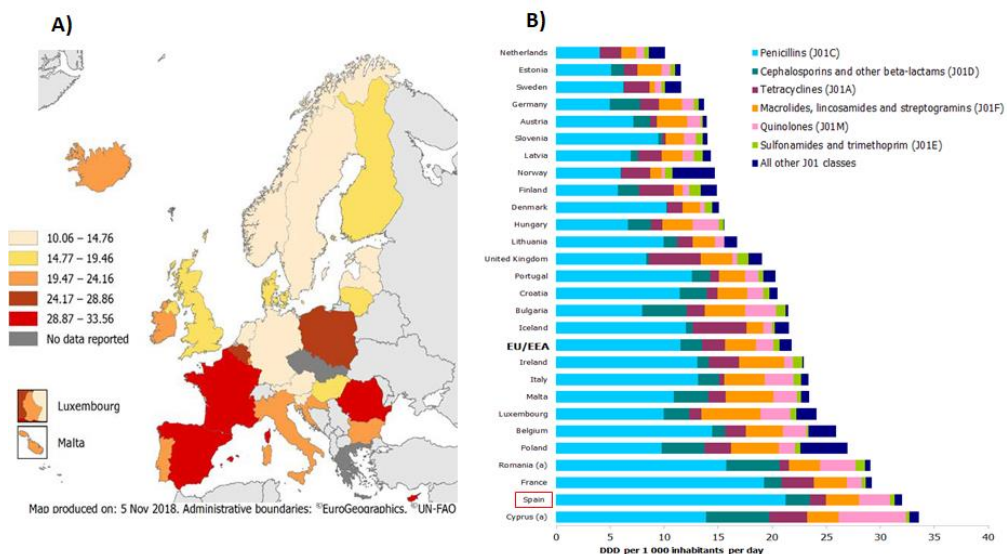


Figura 4. Consumo de antibacterianos para uso sistémico en la comunidad, en países de la UE/EEE, 2017, expresado como DDD por 1 000 habitantes por día. A) Mapa de UE/EEE donde se muestra en una escala colorimétrica los niveles de consumo en cada país. B) Histograma donde se muestra el consumo de distintos antibacterianos en cada uno de los países EU/EEE. La barra de EU/EEE muestra el nivel de consumo medio de los países participantes. Enmarcado en rojo, se muestra el consumo en España. Imagen adaptada de la ECDC⁴⁶.

(a) Chipre y Rumania solo proporcionaron los datos conjuntos de consumo en la comunidad y el sector hospitalario.

1.2.2.1. Estructura química, espectro de acción y clasificación de los betalactámicos

Los betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico (anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno). Este anillo puede estar unido a otros anillos secundarios además de a distintos radicales lineares. La combinación de estos anillos secundarios y los radicales modifica las propiedades del compuesto, dando lugar a los distintos grupos de antibióticos betalactámicos⁴⁷ (Fig. 5).

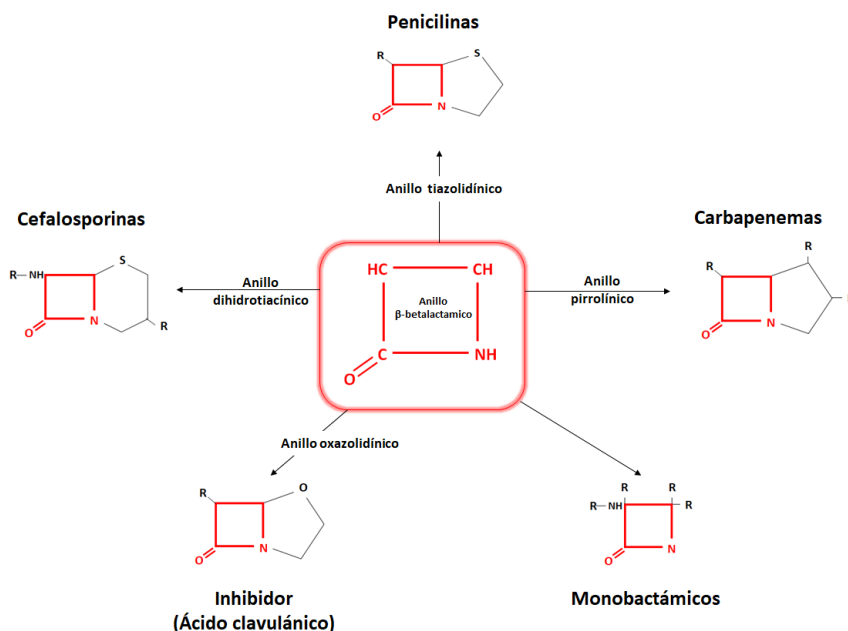


Figura 5. Estructura química básica de los distintos grupos de betalactámicos. En el centro y en rojo se muestra el anillo betalactámico, *core* de todos los compuestos de la familia. En negro se indican los distintos anillos secundarios y radicales. Figura modificada de Suárez C 2009⁴³.

El espectro de acción de los betalactámicos en general incluye, grampositivos, excepto *Staphylococcus* resistente a meticilina (algunas cefalosporinas de 5ª generación si tienen actividad), bacterias gramnegativas (enterobacterias y no fermentadores), con excepción de los productores de enzimas que hidrolizan las moléculas de estos agentes, y espiroquetas. No son activos frente a micoplasmas porque estos carecen de pared celular (lugar de acción de los betalactámicos), ni sobre bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*^{43,48}.

Los betalactámicos se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes además de un quinto que son inhibidores de betalactamasas (Tabla 2, Fig. 5): I) Penicilinas; II) Cefalosporinas, actualmente existen cinco generaciones la evolución de las cuales se asocia a un incremento de su espectro y de su actividad intrínseca frente a gramnegativos a expensas, en general, de una progresiva reducción de la actividad frente a grampositivos; III) Monobactámicos, el anillo betalactámico no se encuentra vinculado a ningún anillo secundario; IV) Carbapenémicos, presentan el mayor

espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos; y V) Inhibidores de las betalactamasas, con actividad antimicrobiana intrínseca insignificante, pero su similitud en la estructura química permite a la molécula interactuar con la enzima betalactamasa y reestablecer la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos⁴⁵.

Tabla 2. Clasificación de los principales antibióticos betalactámicos

Grupo	Subgrupo	Antibacteriano
Penicilinas	Naturales (bencilpenicilinas)	Bencilpenicilina (penicilina G), fenoximetilpenicilina (penicilina V)
	Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina, ticarcilina
	Ureidopenicilinas	Mezlocilina, piperacilina
	Resistentes a penicilinasas	Meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina
Cefalosporinas	1ª generación	Cefalexina, cefradoxilo cefazolina, cefalotina
	2ª generación	cefonicida, cefuroxima, cefoxitina, cefotetán
	3ª generación	cefixima, ceftibuteno, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, ceftizoxima
	4ª generación	Cefepima, cefpiroma
	5ª generación	Ceftarolina, ceftobiprole
Monobactámicos		Aztreonam
Carbapenémicos		Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
Inhibidores de betalactamasas		Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam, avibactam*, vaborbactam

Información extraída de Arnau de Bolós 2002, Gómez *et al.* 2015 y Bush 2019⁴⁸⁻⁵⁰.

*no betalactámico

1.2.2.2. Mecanismos de acción

Los antibióticos betalactámicos son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (peptidoglicano) bacteriana e induciendo además un efecto autolítico.

La síntesis de la pared de peptidoglicano se lleva a cabo en tres etapas. En la primera etapa, en el citoplasma, tiene lugar la síntesis de los precursores solubles GlcNAc y MurNAc y su activación al unirse a uridín difosfato (UDP); además de la unión de los distintos péptidos al MurNAc. En la segunda etapa, translocasas y transferasas se

encargan de la transferencia de los precursores desde el citoplasma a la membrana citoplasmática y también tiene lugar la formación del enlace β -1,4 entre MurNAc y GluNAc. También tiene lugar el llamado “flip-flop”, donde los precursores, unidos a la membrana interna por la parte citoplasmática, se dan la vuelta encarándose hacia el periplasma. En la última etapa, se da lugar la transglicosilación por glicosiltransferasas que unen los disacáridos con el extremo libre de la cadena preexistente de peptidoglicano y, la transpeptidación, llevada a cabo por las transpeptidasas, enzimas que catalizan la formación de los enlaces entre las cadenas peptídicas de cada monómero (Fig. 6). Tanto las transglicosilasas como las transpeptidasas se conocen con el nombre de proteínas de unión a la penicilina (PBP, del inglés *penicillin binding proteins*), debido a que son la diana de actuación de las betalactamasas^{5,29,51,52}.

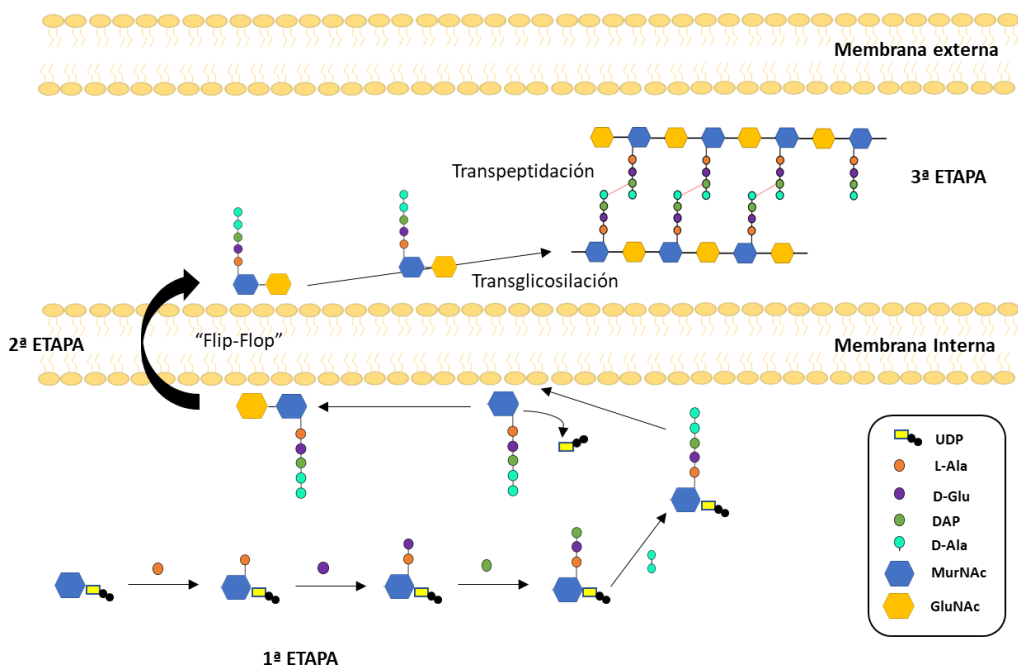


Figura 6. Síntesis del peptidoglicano en bacterias gramnegativas. Se encuentra dividido en tres etapas, 1ª etapa de síntesis de los precursores, 2ª etapa de transporte de los monómeros del citoplasma al espacio periplasmático, y 3ª etapa de transglicosilación y transpeptidaciónⁱⁱⁱ.

ⁱⁱⁱ Imagen elaborada en el presente estudio

Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión (transpeptidación), última etapa de la síntesis de la pared celular. El anillo betalactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen las transpeptidasas, por lo que es capaz de unirse a ellas de forma covalente e impedir así la formación de la pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que los betalactámicos actúen, es necesario que la bacteria se encuentre en fase de división celular, ya que es cuando se sintetiza la pared celular y las PBP entran en acción. Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano⁵²⁻⁵⁴.

1.2.3. Mecanismos de resistencia a los betalactámicos

Como se ha comentado anteriormente, la resistencia a betalactámicos constituye, actualmente, un problema de salud pública en el tratamiento de infecciones por gramnegativos. Esta puede ser tanto intrínseca como adquirida según el microorganismo. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los betalactámicos mediante tres mecanismos principales^{29,43,52,55} (Fig. 7):

- a) Disminución de la concentración: esto sucede por alteraciones en la permeabilidad de la membrana. Los betalactámicos deben difundir o usar canales de porinas de la membrana externa para acceder al interior de la célula bacteriana; por lo que, la disminución de porinas o el reemplazo de estas por canales más selectivos, disminuyen la permeabilidad dificultando el acceso del fármaco al interior de la célula. Otro mecanismo son las bombas de expulsión, capaces de expulsar al exterior de la célula, un amplio rango de sustratos de forma más o menos selectiva. Una sobreexpresión de estas puede modificar la resistencia basal a los betalactámicos.
- b) Modificación de la diana (PBP): los betalactámicos actúan uniéndose a las PBP con una mayor afinidad que el propio sustrato. Alteraciones estructurales en la diana que eviten la unión del fármaco, pero que mantengan su función habitual,

pueden conferir resistencia. Este mecanismo es más común en bacterias grampositivas como es el caso de *Staphylococcus aureus*.

- c) Producción de enzimas (betalactamasas): estas enzimas producidas por las bacterias, catalizan la hidrólisis del anillo betalactámico. Dado que es el lugar de unión a las PBP, los betalactámicos pierden su función.

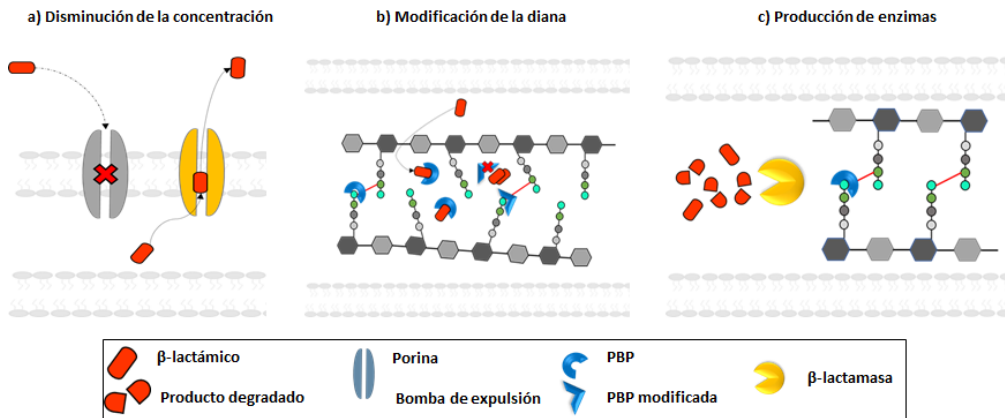


Figura 7. Principales mecanismos de resistencia a betalactámicos. a) Disminución de la concentración (alteración en la permeabilidad), en gris porinas, en amarillo bomba de expulsión; b) modificación de la diana, a la izquierda se muestra el comportamiento normal de las PBP, en el centro su unión a un betalactámico impidiendo su acción, y a la izquierda como su modificación impide la interacción con el betalactámico, pero no con su sustrato natural; c) producción de enzimas, donde en amarillo se muestra la acción hidrolítica de la betalactamasa impidiendo su acción^{iv}.

1.2.3.1. Betalactamasas

En este trabajo nos centraremos únicamente en la producción de betalactamasas, dado que es el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos en la familia *Enterobacteriaceae*, y su transmisión horizontal mediante elementos genéticos móviles como los plásmidos, está contribuyendo a la enorme propagación de este tipo de enzima en todo el mundo microbiano⁵⁶.

^{iv} Imagen elaborada en el presente estudio

Estas enzimas, tienen la capacidad de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico eliminando así, la actividad del fármaco⁵⁷. A partir de la introducción de los betalactámicos en la práctica clínica, son muchas las betalactamasas que se han ido identificando. Teniendo en cuenta que actualmente existen más de 4.000 betalactamasas identificadas con distintos espectros de acción, su diferenciación y clasificación es parte esencial para la práctica clínica⁵⁸ (<http://bldb.eu>).

Existen dos métodos de clasificación principales, uno basado en las características funcionales de estas enzimas (clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros)⁵⁹, y otro según su estructura primaria (clasificación de Ambler)⁶⁰ (Tabla 3). Esta última es la más sencilla, clasificando las betalactamasas en cuatro clases moleculares, A, B C y D, basadas en patrones aminoacídicos conservados y distintivos. Las enzimas de clase A, C y D, utilizan la serina para la hidrólisis del betalactámico en cambio, las de clase B son metaloenzimas que requieren de Zn^{2+} . Aun así, la clasificación funcional resulta más práctica, dado que permite establecer una relación entre el tipo de enzima y la resistencia a los distintos betalactámicos⁶¹.

Tabla 3. Clasificación funcional y molecular de las betalactamasas.

Funcional*	Molecular**	Sustrato	Inhibición por		Enzimas representativas
			AC/TZB ^a	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	no	No	cAmpC ^c , P99, FOX-1, MIR-1,
1e		Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	si	No	PC1
2b		Penicilinas, cefalosporinas de 1 ^a generación	si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be		Cefalosporinas EE ^b , monobactámicos	si	No	TEM-10, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1, GES-1
2br		Penicilinas	no	No	TEM-30, SHV-10
2ber		Cefalosporinas EE, monobactámicos	no	No	TEM-50
2c		Carbenicilina	si	No	PSE-1, CARB-3
2ce		Carbenicilina, cefepime	si	No	RTG-4
2d		D	Cloxacilina	Variable	No
2de	Cefalosporinas EE		variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	Carbapenems		variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas EE	Si	No	CepA
2f		Carbapenems	variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenems	no	si	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B2)		L1, CAU-1, GOB- 1, FEZ-1		
3b	B (B3)		no	si	CphA, Sfh-1

Tabla adaptada de Bush K y Jacoby GA⁶¹

^aAC, ácido clavulánico; TZB, tazobactam

^bEspectro extendido (de la 2^a a la 4^a generación de cefalosporinas)

^cAmpC cromosómica

*Clasificación de Bush y Jacoby; **Clasificación de Ambler

1.2.3.1.1. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las betalactamasas de espectro extendido, BLEE, que pertenecen a la clase molecular A de Ambler y al grupo funcional 2be, son serinoenzimas (Tabla 3). Se caracterizan por su capacidad de hidrólisis tanto de penicilinas como cefalosporinas de 1^a y 2^a generación, oximino-cefalosporinas (3^a y 4^a generación) y monobactámicos. Permanecen inactivas frente a las cefamicinas y, la mayoría de ellas, son sensibles a los inhibidores de las betalactamasas^{50,62,63}.

Las primeras BLEE que surgieron, derivaron de betalactamasas pertenecientes al grupo 2b (SHV-1, TEM-1 o TEM-2). Las mutaciones en el centro activo de estas enzimas 2b, han llevado a la aparición de las BLEE, difiriendo de ellas en no más de dos o tres aminoácidos pero ampliando su espectro de resistencia⁶².

Actualmente, las BLEE de tipo TEM y SHV, han disminuido en frecuencia como consecuencia de su reemplazo por BLEE de la familia CTX-M, enzimas que se reportaron por primera vez en la década de los 80 y que hoy en día, se han convertido en las BLEE más comunes y difundidas a nivel mundial. Existen múltiples variantes dentro de esta familia, pero *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14} (grupo 1 y 9, respectivamente) son, actualmente, los genotipos predominantes, encontrándose en todo tipo de ambientes (aguas, alimentos, animales y humanos)^{50,63,64}. Son comunes en *E. coli* y *K. pneumoniae*, pero también se han detectado en otras especies de *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Enterobacter* spp., así como algunas bacterias no fermentadoras^{65,66}.

A diferencia de las BLEE de tipo TEM y SHV, las enzimas de tipo CTX-M no surgieron como resultado de alteraciones enzimáticas existentes; sino que fueron adquiridas de *novo* por la transferencia del gen desde el cromosoma de *Kluyvera* spp. hacia plásmidos. Las CTX-M fueron nombradas de este modo por su potente actividad hidrolítica frente a la cefotaxima y por el origen de su primer aislamiento en Munich, Alemania^{65,67}. La distribución tanto europea como mundial de las distintas variantes de esta enzima, se encuentra representada en la Figura 8, donde se observa un claro predominio de las variantes CTX-M-15 y CTX-M-14 en la mayoría de las regiones.

Otras familias de BLEE clínicamente relevantes incluyen GES, PER, VEB, BES, BEL, SFO y TLA, pero se encuentran con una prevalencia mucho menor que las de tipo CTX-M^{62,68}.

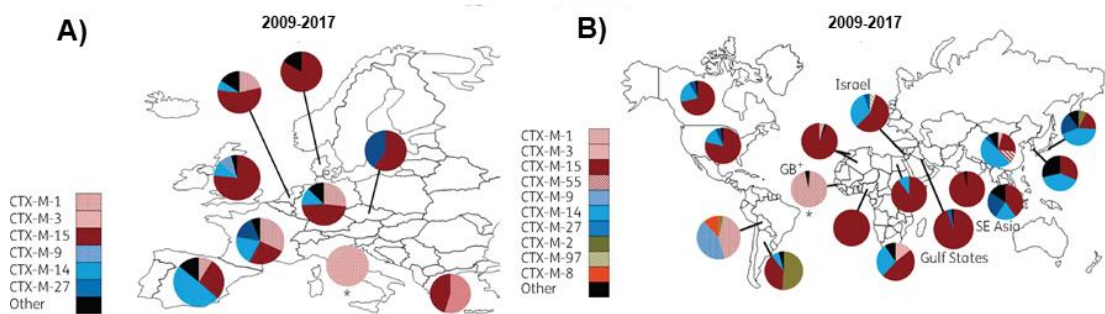


Figura 8. Distribución A) europea y B) mundial de las distintas variantes de CTX-M. Datos de 2009 a 2017. Figura adaptada de Edward R. Bevan *et al.* 2017⁶⁴.

1.2.3.1.2. Betalactamasas de clase C (AmpC)

Estas betalactamasas pertenecen a la clase molecular C de Ambler y al grupo 1 según los perfiles de hidrólisis e inhibición de la enzima de Bush-Jacoby (Tabla 3). Se caracterizan por una mayor hidrólisis de las cefalosporinas incluidas las oxiimino-cefalosporinas, además de las cefamicinas. En menor medida, también son capaces de hidrolizar penicilinas y aztreonam (variable)^{61,69}. La primera betalactamasa identificada con capacidad de hidrolizar la penicilina fue la cefalosporinasa AmpC. Esta se halló en *Escherichia coli* en 1940, varios años antes de la introducción real de la penicilina en la práctica clínica⁴⁰. Las AmpC pueden estar codificadas en el cromosoma (cAmpCs) de algunas especies de Enterobacterales. Se trata de enzimas de baja expresión, pero inducibles en respuesta a la exposición a agentes betalactámicos. La causa más común de sobreexpresión de AmpC en aislados clínicos es una mutación en el gen *ampD*, la cual conlleva a una hiperinducibilidad de AmpC o una hiperproducción constitutiva^{69,70}. Algunos microorganismos presentan características adicionales para la regulación de AmpC, por ejemplo, *E. coli* carece del gen regulador *ampR* por lo que, AmpC no es inducible y se encuentra regulada bajo un promotor y mecanismos atenuadores^{71,72}. Las enzimas AmpC, también se encuentran codificadas en plásmidos, lo cual puede conferir resistencia a microorganismos que carecen o que presentan una expresión pobre del gen *bla*_{AmpC} cromosómico, como en el caso de *K. pneumoniae* o *E. coli*, respectivamente^{69,70}.

Existen múltiples variantes de betalactamasas AmpC, entre ellas, ACC, CMY, DHA, EBC, FOX, MOX, LAT, MIR. Algunas de ellas como la CMY, presentan una gran difusión a nivel mundial gracias a su movilización a través de plásmidos y su presencia en múltiples ambientes; destacando entre estas variantes, la CMY-2, asociada a la secuencia de inserción *ISEcp1*^{69,73}.

1.2.3.1.3. Carbapenemasas

Las carbapenemasas forman parte de las clases moleculares A (grupo 2f), B (grupo 3) y D (grupo 2df) (Tabla 3). Representan el grupo de betalactamasas más versátiles, con capacidad de hidrolizar tanto penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos como carbapenems; además, la mayoría son resistentes a la acción de los inhibidores de betalactamasas⁷⁴.

Dentro de la clase molecular A, se han identificado distintas variantes. Algunas de ellas de codificación cromosómica como SME (*Serratia Marcescens Enzyme*), IMI-1 (*IMiPenem-hydrolyzing β -lactamase*) y SFC-1 (*Serratia fonticola Carbapenemase-1*), y otras de codificación plasmídica como KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*; KPC-2 a KPC-13), IMI (IMI-1 a IMI-3) y GES (*Guiana Extended Spectrum*; GES-1 a GES-20). Todas ellas hidrolizan activamente los carbapenémicos y están parcialmente inhibidas por ácido clavulánico^{75,76}. De estas, las infecciones por Enterobacterias productoras de KPC (*K. pneumoniae* y *E. coli* en segundo plano) son las más frecuentes y extendidas a nivel global, causando brotes de importancia clínica debido a su resistencia a la mayoría de los betalactámicos^{75,77}.

Otro grupo de carbapenemasas importante son las de clase B o metalobetalactamasas. Las carbapenemasas más comunes dentro de la clase molecular B son, la NDM-1 (*New Delhi Metallo- β -lactamase*), las IMP (*active on IMiPenem*), las VIM (*Verona integron-encoded Metallo- β -lactamase*), la GIM (*Germany IMiPenemase*) y la SIM (*Seoul IMiPenemase*). Los genes *bla*_{NDM} predominan en *K. pneumoniae* y *E. coli*; la mayoría de IMP se han detectado en

especies de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* además de en la familia *Enterobacteriaceae*; por otro lado, las VIM raramente se encuentran en *Enterobacteriaceae*, siendo más comunes en *Pseudomonas*⁷⁷.

Por último, las carbapenemasas de clase D (serin-carbapenemasas) son de tipo OXA (**OXA**cillin-hydrolysing carbapenemases). Estas enzimas se encuentran principalmente en organismos no fermentadores como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero debido al uso de carbapenémicos para combatir cepas productoras de BLEE y AmpC, se ha promovido un rápido aumento de la presencia de carbapenemasas en Enterobacterias. Actualmente, la OXA más común y diseminada por los distintos continentes es la OXA-48 seguida por la OXA-23, más diseminada en Europa y USA⁷⁷.

1.2.3.2. Incremento del número de betalactamasas detectadas y de su prevalencia

A lo largo de las últimas dos décadas, ha habido un claro aumento del número de enzimas de las principales familias de betalactamasas. La Figura 9, los datos de la cual han sido recopilados de distintos microorganismos, fuentes y años por Karen Bush⁶³, a partir de la literatura, muestra un total de 2.771 variantes distintas de betalactamasas y, se puede observar cómo, a partir de los años 90, las betalactamasas de clase A seguidas de las de clase C sufren un claro incremento en número (Fig. 9A). Este incremento en estas dos clases de betalactamasas viene dado principalmente por el aumento en el aislamiento de cepas productoras de BLEE (clase A, grupo 2br) y AmpC (clase C, grupo 1) (Fig. 9B). Si observamos más en detalle, podemos ver como a partir de los años 2000-2005, la diseminación a nivel mundial de las enzimas BLEE tipo TEM, SHV y CTX-M, y las enzimas AmpC tipo CMY son las principales responsables de este incremento tan pronunciado (Tabla 4).

Aun así, hay que tener en cuenta que la metodología para su identificación y caracterización ha dado un gran salto en los últimos años, y actualmente, la PCR y la

secuenciación son herramientas rápidas, de fácil acceso y precios asequibles, que facilitan el aumento de datos disponibles.

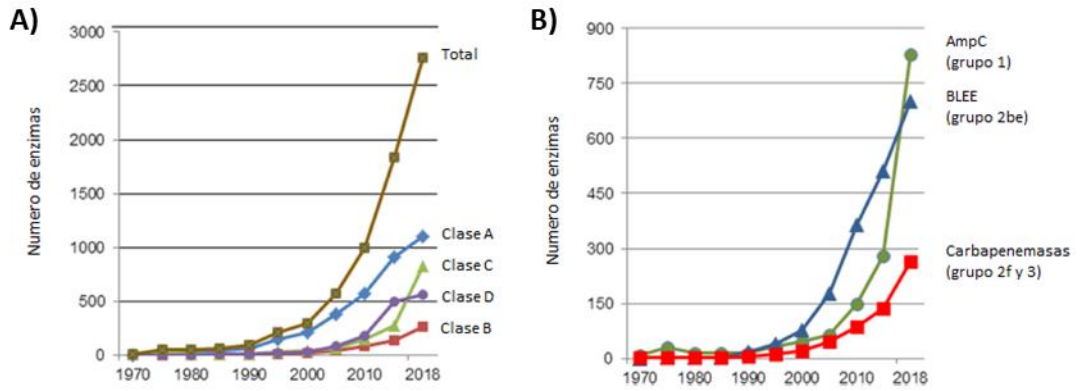


Figura 9. Incremento en el número de betalactamasas (n=2.771). A) Betalactamasas descritas según las clases moleculares A, B, C o D. B) Betalactamasas citadas según los principales grupos funcionales con el nombre genérico principal, AmpC, grupo 1; BLEE, grupo 2be; y carbapenemasas, grupos 2f y 3. Figura adaptada de Bush K 2018⁶³.

Tabla 4. Incremento del número de betalactamasas por año^a

Enzima	Clase	Grupo funcional	Número por año						
			1961	1995	2000	2005	2010	2015	2018
CMY	C	1	0	1	6	22	64	136	139
PDC ^b	C	1	0	1	1	1	10	30	226
ADC ^c	C	1	0	0	1	7	7	7	81
TEM	A	2b, 2be, 2br	0	36	86	153	178	219	224
SHV	A	2b, 2be, 2br	0	6	26	89	134	182	193
CTX-M	A	2be	0	2	9	51	103	172	182
KPC	A	2f	0	0	0	3	11	22	24
OXA	D	2d	0	18	28	88	202	498	520
IMP	B	3	0	1	3	23	29	48	53
VIM	B	3	0	0	2	12	27	41	46
NDM	B	3	0	0	0	0	1	12	14
Total estimado			-	217	309	584	1.003	1.855	2.771

^aTabla adaptada de Karen Bush 2018⁶³ con datos extraídos de Bush 2011, <http://www.lahey.org/Studies/> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047>

^bPDC, *Pseudomonas-derived cephalosporinase*

^cADC, *Acinetobacter-derived cephalosporinase*

Todo este incremento tanto del número de enzimas descritas, como de la prevalencia de cada una de ellas en enterobacterias, ha hecho que se observe un crecimiento en las tasas de resistencia a betalactámicos.

Según los datos de la ECDC reportados en 2018, los mayores porcentajes de aislamientos de *E. coli* resistente a cefalosporinas de 3^a generación en Europa se dieron en Italia (28,7%), Eslovaquia (30,1%), Chipre (37,1%) y Bulgaria (38,7%); pero la mayoría de Europa se encuentra entre un rango de 5 y 25% de los aislamientos. En cambio, los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes se encuentran entre el 25 y 75% en la mayoría de los países europeos (Fig. 10).

Los aislamientos de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenémicos son inferiores al 1% en prácticamente toda Europa y para *K. pneumoniae* los países de mayor aislamiento son Italia (26,8%), Rumania (29,5%) y Grecia (63,9%) (Fig. 10).

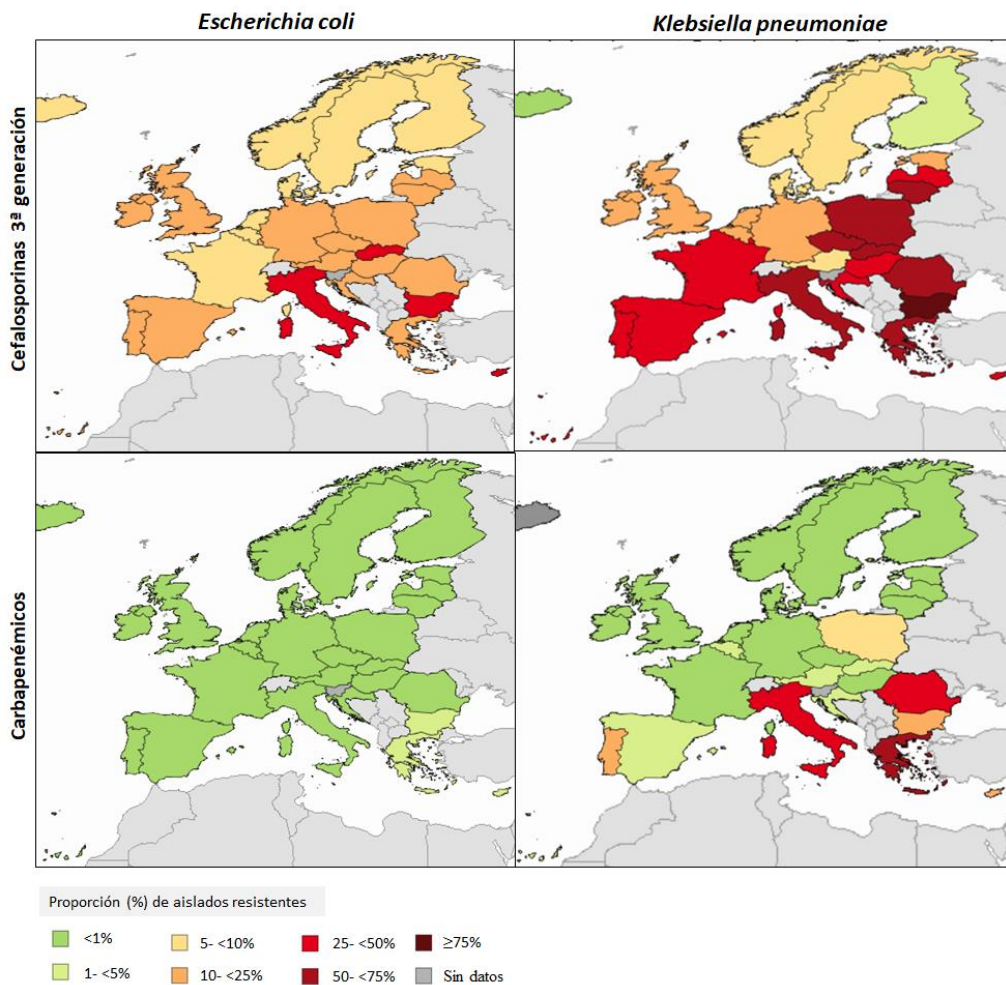


Figura 10. Aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y carbapenémicos a nivel europeo en 2018. Imágenes extraídas de la ECDC (<https://atlas.ecdc.europa.eu>).

1.3. Elementos genéticos móviles

Como se comentó anteriormente, la resistencia a betalactámicos como a otros antimicrobianos puede ser de origen extracromosómico, localizándose en elementos genéticos móviles (EGM).

Los EGM son segmentos de ADN que codifican enzimas y otras proteínas que median el movimiento de estos segmentos de ADN en cuestión (ej. genes de resistencia antibiótica), dentro del genoma de una bacteria (movilidad intracelular) o entre distintas células bacterianas (movilidad intercelular)⁷⁸. El movimiento intercelular puede llevarse a cabo por los procesos de transformación, transducción y conjugación descritos en el apartado 1.4. Dentro de los elementos que promueven el movimiento intracelular, cabe destacar las secuencias de inserción (SI), los transposones (Tn) y los integrones:

- **Secuencia de inserción (SI):** segmento de ADN corto de entre 1 y 2 Kb aproximadamente, que contiene únicamente, aquella información genética necesaria para su transposición. Codifican para enzimas denominadas transposasas (Tnp), responsables de la integración de la SI al sitio diana del genoma; y se caracterizan por presentar dos repeticiones terminales invertidas (IR) flanqueando la transposasa. Estas IR son reconocidas de forma específica por la transposasa (Fig. 11A). Existen múltiples secuencias de inserción distintas, cada una con su propia Tnp e IR, nombrándose cada una de ellas con un número (ej. IS1, IS2, etc.)⁷⁹ (<https://isfinder.biotoul.fr/>).
- **Transposones (Tn):** segmentos de ADN que, además de portar el material genético necesario para su transposición, pueden codificar también para distintos genes que ofrecen diferentes características fenotípicas a las bacterias que los portan. Existen dos tipos: los denominados Tn simples (Fig. 11B), compuestos por una SI y genes accesorios como pueden ser los genes de resistencia a antimicrobianos, y los Tn complejos (Fig. 11C) compuestos por genes accesorios flanqueados por SI⁸⁰.



Figura 11. Representación esquemática de elementos de inserción. A) Secuencia de inserción, B) transposón simple, y C) transposón complejo

- **Integrones y casetes génicos:** Los integrones son secuencias genéticas que permiten la adquisición, almacenamiento, escisión y reordenamiento de genes que se encuentran en elementos móviles llamados casetes. La estructura de un integrón (Fig. 12) incluye una parte constante y una matriz de casetes variable. La parte constante contiene: 1) un gen que codifica un tipo de integrasa (*IntI*), que realiza la integración y escisión de los casetes; 2) un sitio de recombinación para la integración de casetes (*attI*), que se encuentra corriente arriba (*upstream*) del gen *intI*; y 3) un promotor (*Pc*) dentro del gen *intI* o entre *intI* y el sitio *attI*, que está orientado hacia el punto de integración, permitiéndole la expresión de casetes.

Los casetes son elementos móviles no replicativos circulares que consisten en un solo gen (ocasionalmente dos) sin promotor y un sitio de recombinación *attC*. Por lo general, estos elementos se vuelven funcionales al ser insertados en un integrón dado que pasan a estar bajo la influencia de su promotor. Los sucesivos eventos de integración dan como resultado el ensamblaje de una matriz de casetes, de los cuales solo se expresa el subconjunto más cercano al sitio de integración. Los casetes se pueden escindir aleatoriamente y luego integrarse en la primera posición de la matriz donde su expresión es máxima^{81,82} (Fig. 12B).

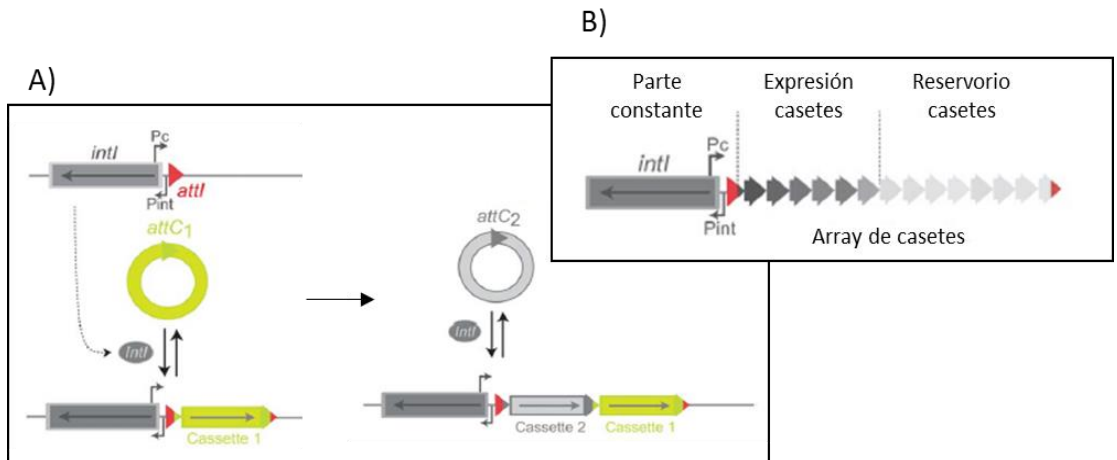


Figura 12. Organización de un integrón. A) Inserción y escisión de casetes: se muestra el gen *intI1* codificante de integrasa y el promotor (Pint), y el lugar de recombinación *attI* (triángulo rojo). Se representa la inserción del casete en el integrón (*attC* × *attI*) catalizada por la integrasa IntI. B) Expresión de casetes: representados por pequeñas flechas. Su nivel de expresión se refleja en la intensidad del color de cada flecha. Figura adaptada de Escudero *et al.*⁸¹

Dentro de los elementos que promueven el movimiento intercelular (transferencia horizontal) (Fig. 13), los principales son, los bacteriófagos descritos en el apartado de transducción (apartado 1.4.2), los plásmidos (descritos con detalle en el apartado 1.5) y los elementos conjugativos integrativos (ECI).

- Los **ECI** o también denominados transposones conjugativos, son elementos autotransferibles por conjugación que se integran en el cromosoma del huésped y se replican como parte de ellos. La inserción de los ECI en el cromosoma se produce por recombinación específica de sitio (*attB* en el cromosoma y *attI* o *attP* en la forma libre circular del ECI). Tanto la integración en el cromosoma como su escisión se llevan a cabo por una integrasa propia del ECI. Además de las funciones esenciales de integración, escisión, mantenimiento, conjugación y regulación, presenta una región variable en la que se insertan los genes accesorios (ej. genes de resistencia antibiótica)^{82,83} (Fig. 13D).

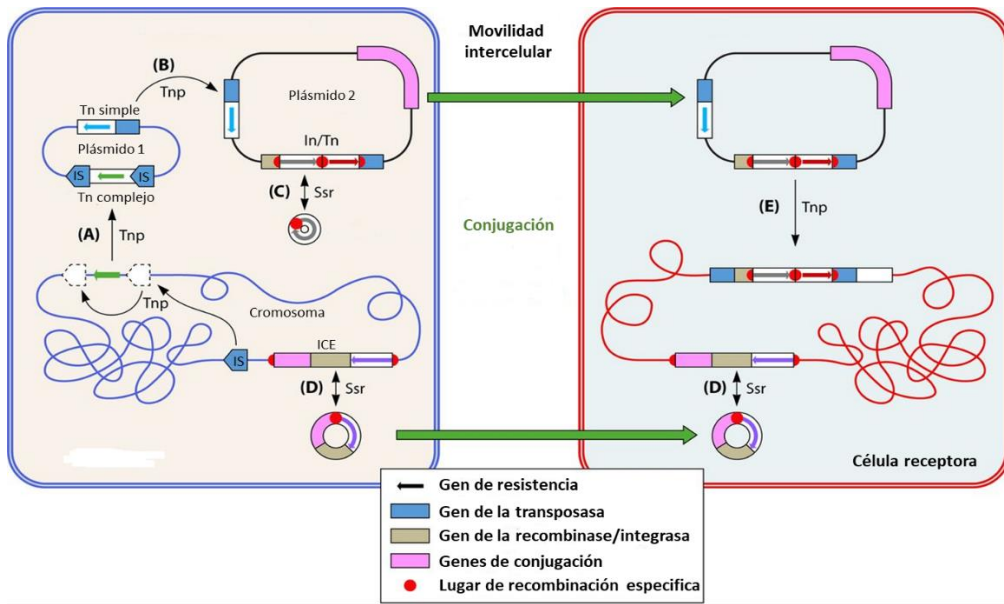


Figura 13. Elementos genéticos móviles (EGM) y procesos implicados en la movilidad intracelular o intercelular de genes de resistencia a antibióticos. Las flechas negras delgadas indican procesos intracelulares, mediados por transposasas (Tnp) o recombinasas (Ssr). Las flechas verdes representan la transferencia intercelular. A) Movimiento de un transposón (Tn) complejo a un plásmido 1. B) Transposición de un Tn simple del plásmido 1 al plásmido 2. C) Inserción y escisión de un casete en un integrón de clase 1 (In/Tn). D) Integración en el cromosoma o escisión como elemento circular de un ICE. En forma circular se puede producir, por conjugación, su transferencia a una célula receptora integrándose (reversiblemente) en un sitio de recombinación específico del cromosoma. E) Transferencia por conjugación del plásmido 2 de la célula donadora a la receptora con movimiento del In/Tn de clase 1 del plásmido entrante a un transposón localizado en el cromosoma de la célula receptora. Figura modificada de Partridge *et al.*⁸².

1.4. Mecanismos de transferencia horizontal

1.4.1. Transformación

La transformación se define como la captación estable, la integración y la expresión funcional de ADN libre adquirido del espacio extracelular (Fig. 14A). Para que este fenómeno se produzca, las células bacterianas primero deben desarrollar un estado fisiológico regulado de competencia. La mayoría de las bacterias transformables naturalmente desarrollan una competencia limitada en el tiempo en respuesta a

condiciones ambientales específicas tales como condiciones de crecimiento alteradas, acceso a nutrientes, densidad celular o inanición. De este modo, los requisitos previos para la transformación natural incluyen, la liberación y persistencia de ADN extracelular, la presencia de células bacterianas competentes con capacidad de unión (por receptores de la superficie celular) a ADN, degradación y estabilización del ADN libre, y la capacidad del ADN traslocado para ser integrado en el genoma de la célula receptora de forma estable o ser recircularizado formando un plásmido replicativo. La integración en el genoma se lleva a cabo por recombinación homóloga. Si el ADN foráneo no es apto para esta recombinación, será degradado^{34,84,85}.

1.4.2. Transducción

Es el proceso por el cual el ADN es transferido de una bacteria a otra mediante bacteriófagos como vectores (Fig. 14B). Los bacteriófagos (fagos) son virus bacterianos con genoma ADN o ARN encapsulado en una cápside proteica. Los fagos se adhieren a receptores específicos de la superficie bacteriana y posteriormente inyectan sus genomas en el citoplasma celular. A partir de aquí, existen dos tipos de ciclos infectivos. El ciclo lítico, se produce por fagos virulentos los cuales manipulan la maquinaria metabólica bacteriana para producir proteínas virales y copias del genoma viral. Posteriormente, las partículas virales se ensamblan y se produce su liberación al medio extracelular como consecuencia de la lisis bacteriana. En los ciclos lisogénicos, los fagos temperados, integran su material genético en el cromosoma bacteriano (profago), transfiriéndose de forma vertical hasta que condiciones de estrés ambiental activan el ciclo lítico promoviendo la liberación de los fagos al medio extracelular⁸⁵⁻⁸⁷.

Se han descrito dos tipos de transducción, la generalizada que ocurre en fagos líticos y la especializada que tiene lugar con fagos lisogénicos⁸⁷⁻⁸⁹:

- Transducción generalizada: los fagos líticos, fragmentan el ADN bacteriano. En el momento del empaquetamiento del ADN en las cápsides fágicas, puede ocurrir que en vez de incorporar el propio genoma fágico, se incorpore material genético bacteriano generando así partículas fágicas defectivas. Este fenómeno representa, aproximadamente, el 1% del total de las partículas fágicas y se caracteriza por captar de forma aleatoria cualquier fragmento del genoma bacteriano, ya sea cromosómico o plasmídico.
- Transducción especializada: se debe a una escisión defectuosa del profago del cromosoma bacteriano que conduce al empaquetamiento de ADN tanto bacteriano como fágico. Este tipo de transducción solo transfiere los genes bacterianos que se encuentran cerca del sitio de integración del profago.

Finalmente, estos fagos con material genético bacteriano, al infectar otras células, inyectan material bacteriano promoviendo el movimiento intercelular de genes.

1.4.3. Conjugación

La conjugación fue descrita por primera vez por Joshua Lederberg y Edward L. Tatum en 1946. Se trata del principal mecanismo de diseminación de genes por transferencia horizontal. La conjugación se basa en el intercambio unidireccional de material genético desde una bacteria donante a otra receptora mediante contacto directo. Esta transferencia de ADN puede darse entre bacterias tanto de la misma especie como entre especies, además de entre células procariotas y eucariotas^{85,90,91} (Fig. 14C). La transferencia de estos genes conjugativos requiere de la maquinaria apropiada para garantizar la movilización y transferencia del ADN (genes *mob* y *tra*) y de la formación de lo que se denomina pilus conjugativo o en inglés *Mating pair formation* (genes *mpf*). Estos genes pueden ser codificados por plásmidos o por elementos conjugativos integrativos (ECI) insertados en el cromosoma. La conjugación en bacterias gramnegativas está mediada por el sistema de secreción de Tipo IV (T4SS), un gran complejo macromolecular involucrado en el transporte de ADN/proteínas y la biogénesis del pilus conjugativo (MPF)⁹². Esta estructura media

el contacto célula-célula para generar una unión entre las bacterias y un poro a través del cual el ADN plasmídico y algunas proteínas codificadas por la célula donadora pueden transportarse hasta la receptora⁸⁴. En ocasiones, un plásmido puede integrarse en el cromosoma bacteriano, de modo que, en el momento de la conjugación, parte del cromosoma puede ser transferido a la célula receptora⁹³. Los plásmidos se describen en detalle en el siguiente apartado.

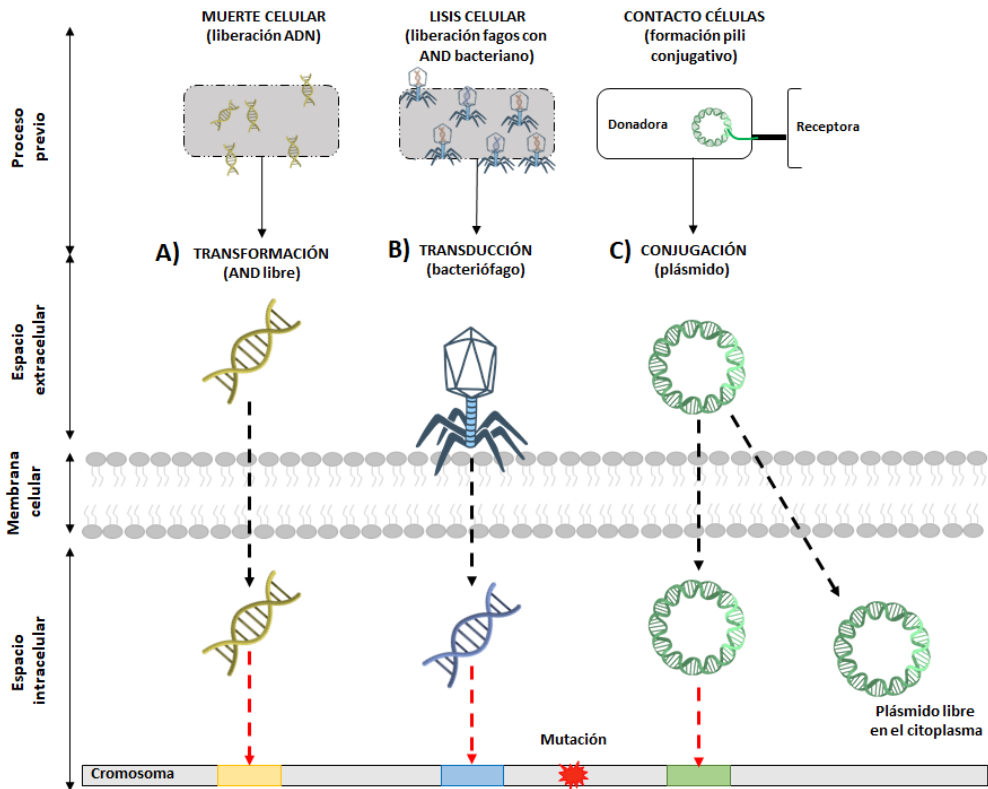


Figura 14. Mecanismos de transferencia horizontal de genes. A) Incorporación de ADN libre (transformación), B) infección por bacteriófagos (transducción), C) adquisición de plásmidos por conjugación. Las flechas en rojo indican la integración en el genoma bacteriano del ADN exógeno por transposición o recombinación. Figura adaptada de Alekshun *et al.*³².

1.5. Los plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos presentes en muchos microorganismos tanto de los dominios *Bacteria* y *Archaea* como del *Eukariota*⁹⁴.

Estos consisten en moléculas circulares de ADN de doble cadena de replicación autónoma, que aportan funciones adicionales a la célula hospedadora; por lo tanto, los plásmidos no son portadores de genes esenciales para el crecimiento y desarrollo de la célula hospedadora, a no ser que existan condiciones ambientales adversas en que los genes adicionales de estos elementos genéticos, puedan conferir ciertas ventajas adaptativas⁸⁴. Los plásmidos presentan sistemas para garantizar su autoreplicación, además de mecanismos que se encargan de mantener, de manera estable, el número de copias en la célula bacteriana y perpetuar su permanencia de generación en generación durante la división celular. Además de su transferencia vertical, los plásmidos denominados conjugativos, presentan la maquinaria necesaria para su transferencia horizontal no solo entre bacteria de una misma especie sino también entre distintas especies, géneros y reinos⁷³.

1.5.1. Organización genética de los plásmidos

Los plásmidos presentan una gran plasticidad genética, un amplio rango de tamaños y capacidad de transferencia variable según su dotación genética. Aunque existe una gran variedad de plásmidos, todos ellos se encuentran organizados bajo módulos funcionales, lo que significa que los genes con funciones relacionadas suelen agruparse en segmentos específicos de la molécula de ADN plasmídica. Una parte considerable del genoma de un plásmido se constituye por funciones relacionadas con su propia supervivencia o propagación formando la parte troncal (*backbone*) del plásmido (módulo de replicación, de estabilidad y de propagación) (Fig. 15). Cada módulo contiene un número relativamente modesto de genes dispuestos de manera compacta, a menudo acompañados por elementos relacionados con su función (orígenes de replicación o transferencia, lugar de segregación de plásmidos denominado centrómero, etc.) Por otro lado, disponen de un conjunto de genes accesorios que confieren funciones adaptativas a la célula hospedadora, entre ellos, genes de resistencia antibiótica o genes de virulencia (módulo adaptativo)^{95,96} (Fig. 15).

Principalmente, existen tres categorías de plásmidos, aquellos con capacidad conjugativa, los movilizables y los plásmidos no transferibles por conjugación. Los **plásmidos conjugativos** requieren de un conjunto considerable de genes troncales, distribuidos en los tres módulos que forman el *backbone*. Los **plásmidos movilizables** presentan los genes necesarios para su movilización, pero carecen de los genes requeridos para la generación del pilus conjugativo, MPF. De este modo, hacen uso de la maquinaria de los plásmidos conjugativos para transferirse a otras células. Por último, los **plásmidos no transferibles**, que carecen del módulo de propagación. Aun así, algunos de ellos pueden ser transferidos por un mecanismo denominado conducción, el cual consiste en la cointegración de un plásmido no movilizable con otro capaz de transferirse⁹⁵.

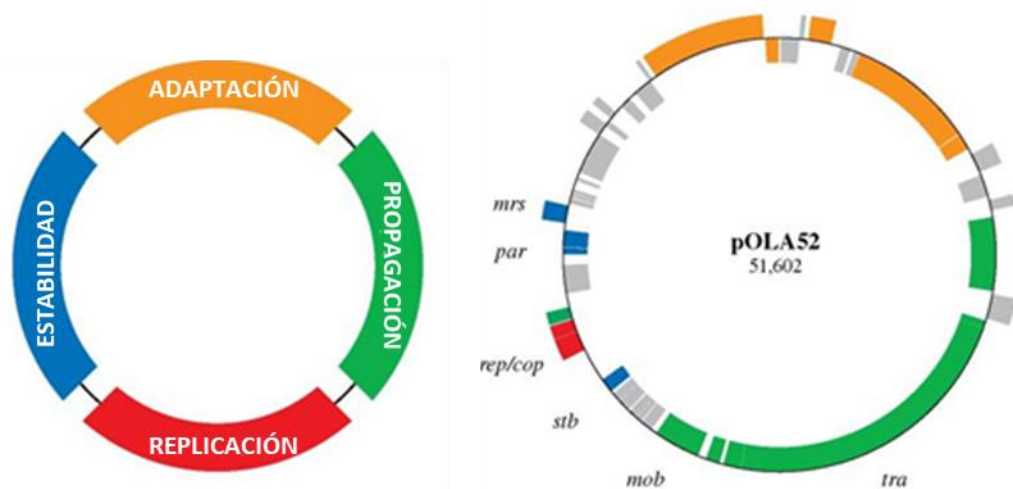


Figura 15. Ejemplo de la organización por módulos funcionales de un plásmido conjugativo. Cuatro módulos genéticos: estabilidad (azul), replicación (rojo), propagación (verde) y adaptación (naranja); comparado con la organización del plásmido IncX1 pOLA52. Los genes que codifican funciones desconocidas o funciones que no están directamente relacionadas con los cuatro módulos se indican en gris. Figura adaptada de Norman *et al.*⁹⁶.

1.5.1.1. Módulo de replicación

El módulo de replicación es el único en común entre las tres categorías de plásmidos. Este determina el número de copias del plásmido y su estabilidad en diferentes

células hospedadoras y condiciones de crecimiento. Este módulo contiene, principalmente, un origen de replicación denominado vegetativo (*oriV*), genes que codifican para proteínas Rep de inicio de replicación y los genes *cop*, que aseguran el mantenimiento de un número estable de copias del plásmido (Fig. 16).

Los plásmidos de menor tamaño suelen ser de alto número de copias en cambio, los plásmidos más grandes, como los plásmidos conjugativos (media de 100 Kb), debido a la carga adicional de módulos de propagación y estabilización, suelen ser de bajo número de copias (<10 copias/célula), minimizando así la carga metabólica en la célula hospedadora⁹⁷.

1.5.1.2. Módulo de estabilidad

Hay tres mecanismos principales por los cuales los plásmidos aseguran su estabilidad:

- a. Resolución de multímeros: los plásmidos multicopia pueden recombinarse entre ellos formando dímeros y multímeros, estructuras inestables que dificultan la segregación plasmídica en la división celular. Para resolver esto, los plásmidos multicopia pequeños contienen un sitio (*cer*), en el que actúa un complejo de resolvasas codificado por el hospedador, que convierte los multímeros en monómeros. Los plásmidos conjugativos, más grandes, presentan sistemas de resolución de multímeros (*mrs*)⁹⁸.
- b. Particionamiento activo: mientras que los plásmidos de alto número de copias se distribuyen adecuadamente debido a una difusión aleatoria, los plásmidos conjugativos de bajo número de copias dependen de mecanismos activos. Estos constan de dos genes, *parA*, que codifican una ATPasa, que proporciona la energía requerida para el movimiento intracelular y la distribución de plásmidos, y *parB* que codifica para una proteína de unión a ADN, uniendo los plásmidos a la región del centrómero^{98,99}.
- c. Adicción plasmídica/muerte postsegregacional (*stb*): algunos plásmidos aseguran su permanencia en la población celular a través de mecanismos que,

de forma selectiva, matan o detienen la replicación de aquellas células hijas libres de plásmido⁹⁸. Se trata de sistemas de toxina/antitoxina que consisten en la producción de una toxina estable (generalmente una proteína), y una antitoxina inestable (una proteína o un ARN). Esta última neutraliza la acción de la toxina o impide la síntesis de la toxina, pero desaparece rápidamente en ausencia del plásmido codificante; por este motivo, las células hijas que no han adquirido el plásmido mueren por presencia de la toxina sin opción a sintetizar la antitoxina⁹⁹.

En la Figura 16, se representan algunos de los genes pertenecientes a este módulo.

1.5.1.3. Módulo de propagación

Este módulo se encuentra presente tanto en plásmidos conjugativos, bajo el *pool* de genes *mob* (formación del relaxoma y procesamiento del ADN) y *tra* (Mpf), como en plásmidos movilizables (*mob*), pero con distinta dotación genética. El primer paso para que la propagación de un plásmido se lleve a cabo es la formación del MPF, mecanismo que permite el contacto entre célula donadora y receptora. En la mayoría de los casos, este proceso se da por la síntesis del sistema de secreción de tipo IV (T4SS) que genera el pili conjugativo (determina el rango de huésped). El segundo paso (procesamiento y transferencia de ADN) implica el corte de una de las hebras del plásmido por la relaxasa (codificada por gen *mob*) en el origen de transferencia (*oriT*). De este modo se forma el relaxoma, un complejo formado por ADN plasmídico monocatenario, relaxasa y otras proteínas. Una proteína de acoplamiento ayuda al relaxoma a acoplarse con T4SS, por donde se transporta a la célula receptora. Finalmente, por replicación por círculo rodante se sintetiza una segunda hebra tanto en la célula donadora como en la receptora (Fig. 16).

Además de todo lo esencial para su transferencia, los plásmidos conjugativos presentan una región génica que incluye genes relacionados con el establecimiento del plásmido en la nueva célula receptora. La entrada de un plásmido a un nuevo

entorno a menudo resulta en la desrepresión de varios genes troncales, debido a la ausencia de proteínas de control en el nuevo ambiente celular. Las bajas concentraciones de moléculas de control de número de copias, causan un aumento de los procesos de replicación para recuperar, de forma rápida, los niveles de copia apropiados. Algunos plásmidos también presentan mecanismos antirestricción que los protegen de las endonucleasas de restricción codificadas por el hospedador, o mecanismos que minimizan la activación de la respuesta SOS del hospedador¹⁰⁰. De este modo, esta región génica aporta estabilidad para la diseminación horizontal, de forma parecida a los mecanismos de estabilidad, mencionados anteriormente, para la transferencia vertical^{95,96}.

1.5.1.4. Módulo de adaptación

Se trata de la región más variable y plástica de los plásmidos. Los elementos de este módulo permiten que las células hospedadoras tengan ciertas ventajas dentro de nichos ambientales específicos. Estos elementos pueden incluir factores de virulencia (colonización de ambientes), genes de resistencia antibiótica o de metales pesados, o la capacidad de metabolizar ciertas fuentes de carbono (Fig. 16).

Estos módulos poseen una estructura mosaica, con múltiples inserciones de secuencias de inserción, transposones o integrones de diferentes orígenes. Normalmente, todo este material foráneo puede reconocerse en un plásmido por diferencias significativas en el contenido de GC en comparación con las zonas troncales⁹⁶.

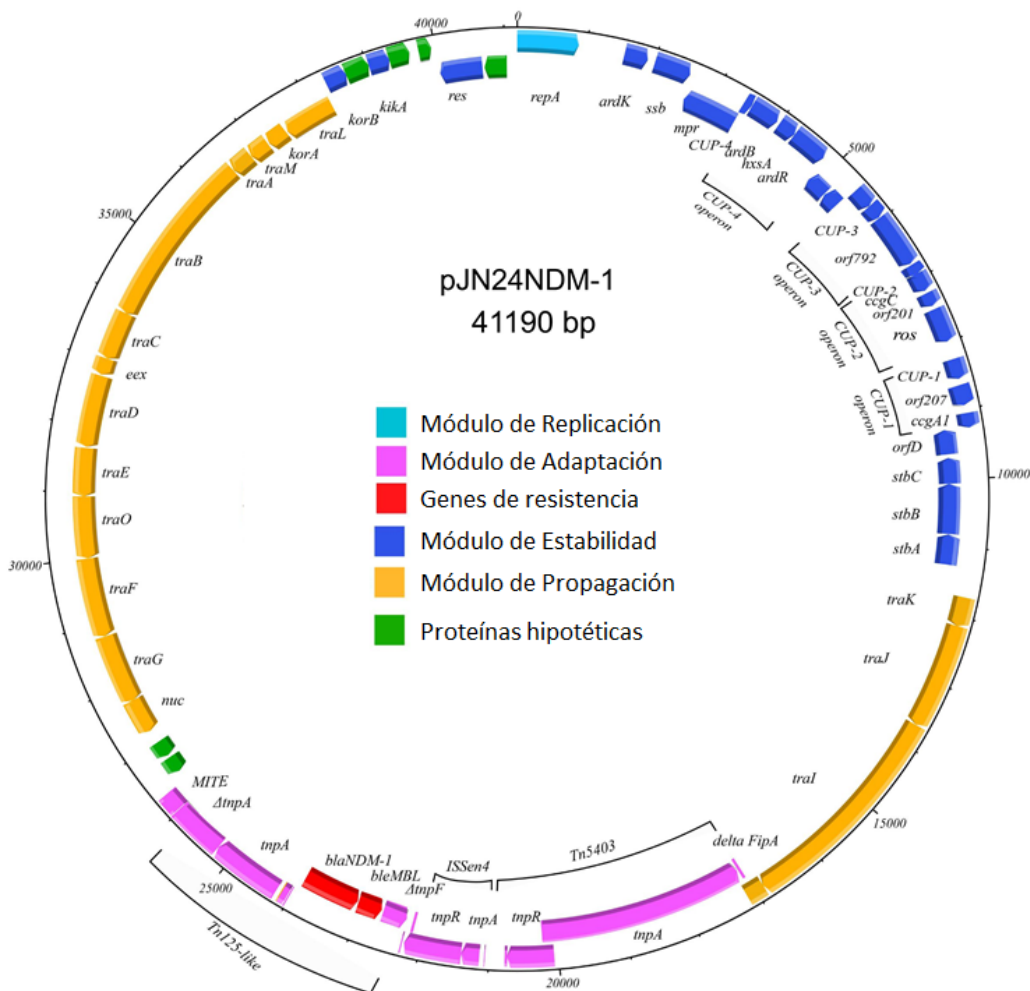


Figura 16. Representación esquemática por módulos del plásmido pJN24NDM1 (nº de acceso de GenBank MK368725), grupo de incompatibilidad IncN. Los genes se encuentran representados en distintos colores según al módulo funcional al que pertenecen. Imagen adaptada de Hao *et al.*¹⁰¹.

1.5.2. Importancia de los plásmidos en la transmisión horizontal de resistencias

Actualmente, los antimicrobianos se usan no solo para combatir infecciones existentes, sino que también se utilizan para su prevención en múltiples procedimientos médicos. Además, su uso alcanza prácticamente todos los ámbitos, desde la clínica al uso en ganadería, agricultura e industria; incrementando drásticamente sus niveles de concentración tanto en ambientes acuáticos como terrestres¹⁰².

Tanto la producción de antibiótico como la resistencia a estos, es un fenómeno natural que tiene lugar en múltiples microorganismos desde antes de su uso por el ser humano. Este fenómeno aporta cierta ventaja a los microorganismos que lo portan eliminando poblaciones microbianas sensibles, reduciendo así a la competencia y ampliando los recursos disponibles para las bacterias resistentes¹⁰³.

El uso elevado de los antibióticos en todos los campos descritos, está generando un drástico aumento de cepas resistentes y reservorios en la microbiota comensal animal, tanto ganadera como salvaje, y en la microbiota humana^{102,104}. Dado que la fijación de una mutación puntual en el genoma bacteriano no es un evento frecuente, la transmisión horizontal de genes juega un papel crucial en la evolución microbiana bajo esta nueva condición de alta concentración de antimicrobianos. De este modo, tanto genes de resistencia como distintos determinantes de virulencia, se encuentran frecuentemente codificados en elementos genéticos móviles que facilitan su transmisión horizontal¹⁰⁵.

La gran problemática llega cuando este elevado flujo de genes de resistencia y virulencia entre bacterias ambientales o de la microbiota comensal, alcanza a microorganismos de importancia clínica. Se cree que, dentro de la transferencia horizontal de genes, los plásmidos son el vehículo de mayor importancia en la diseminación de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas de cualquier ámbito^{106,107}. Su papel crítico en esta diseminación se atribuye a que¹⁰³:

- Son elementos móviles de independencia replicativa, y muchos de ellos, conjugativos.
- La información genética contenida en un plásmido puede ser movilizada por cualquier vía de transmisión horizontal (transformación, transducción y conjugación).
- Pueden tener un amplio rango de hospedadores, transfiriéndose entre bacterias estrechamente relacionadas o no.
- Presentan sistemas que favorecen su persistencia en la célula hospedadora. Además, también pueden permanecer en ellas sin presencia de ningún

elemento de presión selectiva, gracias a cambios en la expresión génica del cromosoma bacteriano que equilibran el gasto que conlleva el transporte del plásmido¹⁰⁸.

- Presentan una región de gran plasticidad genética, siendo capaces de albergar múltiples genes de resistencia simultáneamente.
- Los plásmidos confieren un arsenal de genes funcionales adicionales que podrían aportar a la célula hospedadora una rápida adaptación en ambientes de presión selectiva (más eficaz a corto plazo que una mutación espontánea).
- Permiten la transmisión intercelular de elementos genéticos móviles de transmisión vertical como los transposones e integrones.
- Una única bacteria puede albergar distintos plásmidos, con múltiples genes de resistencia y distintos rangos de hospedador.
- Se ha demostrado que, los plásmidos multicopia aceleran la evolución de la resistencia a los antibióticos, aumentando la tasa de aparición de nuevas mutaciones y amplificando el efecto de las mutaciones debido al aumento de la dosis génica^{109,110}.

1.5.3. Clasificación plasmídica

La capacidad de reconocer y clasificar los plásmidos en grupos homogéneos en base a su relación filogenética nos permite analizar y entender su relación con las células hospedadoras, su distribución en los distintos nichos naturales y, averiguar sus orígenes evolutivos⁷³. La identificación y clasificación de plásmidos debe basarse en rasgos genéticos que se encuentren presentes de manera más o menos constante en la mayoría de plásmidos. Estos criterios se cumplen con aquellos rasgos relacionados con el mantenimiento del plásmido, especialmente con los relacionados con el módulo de replicación, presente en todos los plásmidos. De este modo, las regiones plasmídicas troncales se han estudiado ampliamente como marcadores filogenéticos para su agrupación^{73,95}.

La clasificación de plásmidos adquirió importancia a finales de los años 50, después del descubrimiento de la existencia de plásmidos portadores de genes de resistencia y del reconocimiento de su amplia distribución y presencia en microorganismos de importancia clínica¹¹¹. Su tipificación puede proporcionar información sobre la epidemiología de plásmidos portadores de genes de resistencia, determinando si la diseminación de la resistencia involucra diversos plásmidos o un tipo epidémico dominante. Actualmente, los métodos de clasificación de plásmidos más ampliamente utilizados son por tipificación de los MOB (funciones de movilidad dirigidas por las relaxasas) y por tipificación del replicón (región génica dirigida a la replicación del plásmido y del que deriva la incompatibilidad plasmídica)¹¹².

1.5.3.1. Tipificación de los MOB

En 2009, Garcillán-Barcia *et al.*¹¹³, propusieron un método de clasificación plasmídica basado en la tipificación de la región *mob*. La maquinaria MOB, se encuentra tanto en plásmidos movilizables como conjugativos. Las relaxasas son proteínas esenciales de esta maquinaria de movilización tanto para el inicio como para el final del proceso de conjugación. De este modo, según las características genéticas de estas relaxasas y de sus mecanismos de procesamiento del ADN, los plásmidos movilizables y conjugativos se pueden clasificar en ocho familias MOB: MOB_F, MOB_H, MOB_O, MOB_C, MOB_P, MOB_V, MOB_T y MOB_B¹¹⁴.

1.5.3.2. Tipificación de replicones (Inc/Rep)

La incompatibilidad plasmídica se refiere a la incapacidad de dos o más plásmidos para coexistir de manera estable durante varias generaciones en la misma línea celular bacteriana^{115,116}. La razón más frecuente por la que dos plásmidos son incompatibles es que ambos poseen un replicón con la misma especificidad de proteína Rep o elementos de control de la replicación, generando un estado de competencia que acaba culminando con la pérdida de uno de ellos; en este caso, los

plásmidos se agrupan dentro del mismo grupo de incompatibilidad (Inc). Sin embargo, la incompatibilidad también puede deberse a otros tipos de competencia, como la presencia del mismo o similar sistema de partición¹¹⁷.

La mayoría de los plásmidos producen un represor de replicación cuya concentración es proporcional al número de copias del plásmido; de este modo la replicación del plásmido se lleva a cabo cuando el número de copias y la concentración del represor son bajas y se inhibe cuando son altas. Según las bases moleculares de la incompatibilidad plasmídica nos encontramos con dos situaciones¹¹⁸:

- **Compatibilidad:** cuando una célula contiene dos plásmidos compatibles, cada uno produce un inhibidor distinto, manteniendo su número de copias normal y persistiendo independientemente el uno del otro.
- **Incompatibilidad:** cada plásmido incompatible produce un inhibidor que regula no solo su propia replicación sino también la del otro plásmido. Esta inhibición cruzada hace que el número de copias de cada plásmido por separado sea inferior a la normal, dado que cada plásmido responde a la concentración total del inhibidor, ajustando en consecuencia, su tasa de replicación y el número de copias. En el momento de la segregación, no hay distinción entre los dos plásmidos incompatibles, seleccionándose al azar. De este modo, el número de copias de cada uno de los plásmidos jugará un gran papel para su persistencia en las células progenitoras¹¹⁸:
 - **Mismo número de copias:** si cada inhibidor reprime eficazmente la replicación de ambos, la reacción de incompatibilidad será simétrica. Las líneas celulares que contienen cualquier plásmido surgirán con igual probabilidad.
 - **Distinto número de copias:** el plásmido con mayor número de copias presenta una mayor probabilidad de persistir en la progenie, haciendo que el plásmido de menor número de copias acabe desapareciendo.

Otros factores como el tamaño del plásmido, que puede influir en la velocidad con la que se replica, hace que el plásmido más pequeño presente una ventaja al alcanzar

el número total de copias en la célula en menor tiempo. Otra característica a tener en cuenta es la posesión de más de un replicón (plásmidos multireplicón), que permite a ese plásmido persistir en presencia de la entrada de otro plásmido con el mismo replicón (se comenta más adelante)¹¹⁷.

1.5.3.2.1. Evolución histórica en la clasificación por grupos de incompatibilidad

El primer método de tipificación plasmídica fue desarrollado por Datta y Hedges en 1971¹¹⁵. Este se basaba en el fenómeno de incompatibilidad, introduciendo, por conjugación, un plásmido de grupo Inc desconocido en una cepa receptora portadora de un plásmido ya conocido y, según el resultado de plásmidos en la progenie se clasificaba en el mismo o distinto grupo Inc¹¹⁵. De este modo, se definieron cinco grupos de incompatibilidad, IncI, IncN, IncP, IncF y el IncW^{115,119}. Este método presentaba ciertas limitaciones, como la incapacidad de algunos plásmidos para conjugarse, el hecho de que algunos plásmidos no presentaran marcadores identificativos, además del fenómeno de exclusión de superficie, el cual confiere a los plásmidos residentes en una célula la capacidad de inhibir la entrada de un segundo plásmido, dificultando la distinción entre el propio efecto de incompatibilidad¹¹¹.

En 1988 Couturier *et al.*¹¹¹ propusieron otro método de identificación de plásmidos basado en la tipificación de los replicones. Este consistió en la hibridación por *Southern blot*, utilizando regiones del replicón como sondas, derivadas de 19 replicones distintos. Este enfoque proporcionó la clasificación de plásmidos tanto conjugativos como no conjugativos, pero la baja especificidad del método de hibridación subestimó la diversidad de plásmidos debido a la reacción de hibridación cruzada entre replicones estrechamente relacionados (repl, repB/O, repFII, repFIC)⁷³.

En 1996, Götz *et al.*¹²⁰, aplicaron la técnica de PCR para el tipado de plásmidos, pero se limitaron a los plásmidos IncP, IncN, IncW e IncQ. Posteriormente, en 2005, dada

la necesidad de identificar y situar epidemiológicamente aquellos plásmidos portadores de genes de resistencia, Carattoli *et al.*¹²¹ desarrollaron la tipificación de replicones también basada en PCR (*PCR-based replicon typing*; PBRT). Este esquema se basa en un conjunto de cebadores dirigidos a la amplificación de diferentes regiones (como los genes *rep*, iterones, RNAI) específicas para cada grupo de plásmidos. El método consiste en 5 PCR múltiples y 3 simples, capaces de identificar 18 replicones representativos de los grupos de incompatibilidad de plásmidos circulantes entre *Enterobacteriaceae*. Actualmente, con el fin de facilitar la clasificación de estos plásmidos, se ha desarrollado un kit comercial de la casa Diatheva (PBRT 2.0 kit), que permite, mediante 8 PCR múltiples, la identificación de hasta 30 replicones: HI1, HI2, I1 α /I1 γ , I2, X1, X2, X3, X4, L, M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, FIB KN, FIB KQ, W, Y, P1, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M y FIB-M.

1.5.3.3. Comparación entre el método de tipificación por replicón y relaxasas

Existe una relación directa entre la clasificación por MOB y por replicones. Aun así, ambas presentan ciertas limitaciones y el uso de una u otra debe definirse por su aplicación posterior.

La tipificación por MOB, solo puede darse en aquellos plásmidos que codifican una relaxasa por lo tanto, en plásmidos movilizables o conjugativos, y estos constituyen proporciones variables dentro de los distintos taxones^{122,123}. Por otro lado, el desarrollo de la tipificación por replicones ha ido más dirigido a plásmidos asociados con la familia *Enterobacteriaceae*; aunque también se han ido desarrollando métodos específicos para otros microorganismos, como el AB-PBRT para *Acinetobacter baumannii*¹²⁴. Otra limitación en la tipificación de replicones es que un único plásmido puede contener múltiples replicones, lo que complica la clasificación, mientras que generalmente un plásmido solo codifica una única relaxasa⁹⁵. Sin embargo, la tipificación de replicones proporciona información más detallada sobre la relación entre plásmidos, debido a su mayor resolución (suptipificación; se

desarrolla más adelante)¹¹². En la Figura 17, se muestra la relación entre ambos métodos de clasificación (Inc/Rep y tipo de relaxasa).

En un estudio realizado en 2017 por Orlek *et al.*¹¹², se analizaron un total de 2.097 plásmidos completos de *Enterobacteriaceae* de la base de datos pública del NCBI. En general, se pudieron tipificar 1.872 (89%) plásmidos, 1.784 (85%) se asignaron a un tipo de replicón y 1.371 (65%) a un tipo de MOB. Esto quiere decir que hay un porcentaje de plásmidos que actualmente, aun no somos capaces de tipificar por ninguno de los dos métodos y otro porcentaje que solo logramos clasificar por un método u otro. Otro dato que destacar es que, del total de plásmidos analizados, 1.818 (86,7%) pertenecían a taxones bacterianos de relevancia clínica y de estos, un 92% fueron asignados a un tipo de replicón, resaltando la especificidad del método diseñado por Carattoli *et al.* para tipificar plásmidos clínicos. Además, el tamaño del plásmido también influye en la tipificación por un método u otro. Cuanto menor es el plásmido, el tipificado por MOB es capaz de clasificar un número muy inferior de plásmidos que por tipificación de replicón¹¹². Esto no es de extrañar, ya que los plásmidos movilizables y conjugativos acostumbran a ser más grandes que los que no lo son.

Actualmente, el método de clasificación por grupos de incompatibilidad es el método más utilizado. Esto es debido a que se trata de un método muy bien caracterizado para plásmidos portadores de genes de resistencia en cepas de importancia clínica (enterobacterias). Por estos motivos, la metodología utilizada para el desarrollo de esta tesis doctoral fue el de tipificación plasmídica mediante PBRT.

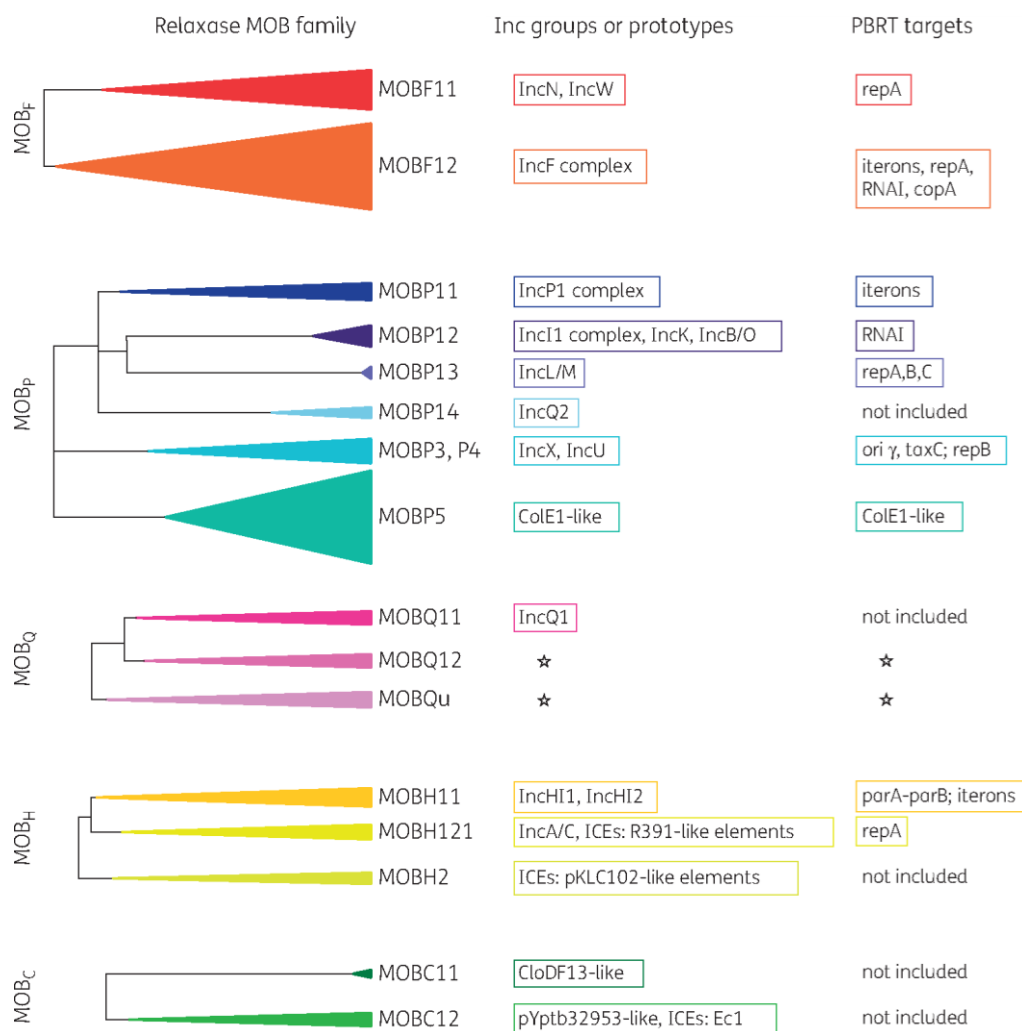


Figura 17. Relación entre la clasificación de plásmidos Inc/Rep y tipo de relaxasa. Figura extraída de Rozwandowicz *et al.*¹²⁵.

1.6. Grupos de incompatibilidad plasmídica más relevantes por su asociación con genes de resistencia antibiótica

La principal característica de los distintos tipos de plásmidos por la cual se les atribuye un grado mayor o menor de relevancia, es su capacidad para asociarse con genes de resistencia antibiótica además, de su predisposición para persistir y difundirse a través de cepas de relevancia clínica. A continuación, se describen los plásmidos más frecuentes.

1.6.1. Plásmidos IncF

Los plásmidos IncF son de los detectados con mayor frecuencia en *Enterobacteriaceae* y su rango de huésped se limita a esta familia. Además, requieren de ciertos factores de la célula hospedadora para su replicación como, ADN girasa y polimerasa III¹²⁶. Normalmente son de bajo número de copias, conjugativos y de un tamaño aproximado de entre 45 y 200 Kb¹²⁵.

Los plásmidos IncF tienen la peculiaridad de poder codificar distintos replicones. El clásico plásmido multireplicón contiene el replicón FII regulado por CopA (ARN antisentido), y un replicón FIB y/o FIA, regulados por iterones. Este estado de multireplicón, permite a estos plásmidos permanecer estables en una célula aún y con la presencia de otro plásmido de replicón incompatible siempre y cuando, el plásmido multireplicón se encuentre bajo el control de uno de los replicones compatibles. También se ha visto, que distintas variantes (alelos) del replicón FII pueden ser compatibles^{126,127}. Estos plásmidos también se detectan de forma frecuente formando cointegrados como por ejemplo con plásmidos IncI1 e IncN¹²⁵.

Por otro lado, cabe destacar que también se han descrito algunos replicones de FII específicos de especies, FIIS en *Salmonella spp.*, FIIK en *Klebsiella spp.* y FIIV en *Yersinia spp.*¹²⁵.

El éxito de los plásmidos IncF, además de por su gran versatilidad, rápida adaptación y estado de multireplicón, también se debe a la presencia de sistemas de adicción y a su asociación con factores de virulencia y con múltiples genes de resistencia antibiótica¹²⁶.

Los plásmidos IncF se han visto asociados a la diseminación de distintos determinantes de resistencia como BLEE, carbapenemasas (*bla_{KPC}*), AmpC (*bla_{CMY}* y *bla_{DHA}*), quinolonas y aminoglucósidos¹²⁵ (Fig. 18). Un claro ejemplo es el del gen *bla_{CTX-M-15}*, localizado principalmente en plásmidos IncF. La expresión de este gen, a menudo asociado con los genes de resistencia *bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-1}* y *aac(6')-Ib-cr*, está dirigida por la secuencia de inserción ISEcp1 (también implicada en la movilización

de *bla*_{CTX-M-15} desde el genoma de *Kluyvera*). El motivo por el que *bla*_{CTX-M-15} a menudo coexiste con *bla*_{TEM-1} en el mismo plásmido, es porque *bla*_{TEM-1} es movilizado por el transposón Tn3, sitio diana para la integración del elemento ISEcp1 – *bla*_{CTX-M-15} en plásmidos IncF⁷³.

1.6.2. Plásmidos IncI

Los plásmidos IncI1, junto a los IncF, se han convertido en una de las familias de plásmidos más comunes en *Enterobacteriaceae*, tanto de origen humano como animal¹²⁸. Son plásmidos de bajo número de copias, rango de hospedador estrecho, normalmente conjugativos y con tamaños variables de entre 50 y 250 Kb¹²⁵.

La familia de plásmidos IncI incluye dos grupos, los plásmidos IncI1 (también denominados IncI α) y los IncI γ , donde diferencias en la secuencia Inc-ARN (inhibe la transducción del ARN de la proteína de replicación RepA) los hace compatibles¹²⁸.

Todos los plásmidos IncI1 se caracterizan por la presencia de un *cluster* que codifica para el pili de tipo IV, el cual contribuye a la adhesión e invasión de *E. coli* veroxigénica. Estos pili son considerados un factor de virulencia que, junto con su capacidad epidémica y distintos determinantes de resistencia asociados, pueden haber favorecido la diseminación de esta familia de plásmidos. Dentro de este *cluster* de conjugación, los plásmidos IncI1 presentan el sistema de exclusión ExcA-TraY; sistema que evita el inicio de la conjugación por exclusión de superficie con aquellas células que ya contengan un plásmido IncI1¹²⁸.

Los plásmidos IncI1 aparecen como uno de los principales vehículos de transmisión de genes BLEE y AmpC (Fig. 18) en aislamientos de *E. coli* recuperados de animales del sector alimentario; en cambio, genes que codifican resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y quinolonas se encuentran más frecuentemente en plásmidos procedentes de *Salmonella entérica*.

1.6.3. Plásmidos IncN

Los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad N, al igual que los anteriores, representan uno de los plásmidos portadores de genes de resistencia más frecuentes en *Enterobacteriaceae*⁷³. Son plásmidos conjugativos, generalmente pequeños de entre 30-70 Kb, de amplio rango de huésped y bajo número de copias¹²⁵. Se encuentran de forma frecuente en presencia de IncF formando cointegrados o como plásmidos individuales^{129,130}.

Los plásmidos IncN muestran una prevalencia relativamente alta en la microbiota fecal de animales sanos, y son uno de los principales vehículos para la difusión de la betalactamasa CTX-M-1 y genes de resistencia a quinolonas en aislados de *Escherichia coli* y *Salmonella* de humanos, animales y del medioambiente^{73,131,132}.

1.6.4. Plásmidos IncA/C

Esta familia de plásmidos es de bajo número de copias y de un tamaño variable de entre 40-230 Kb. Presentan un amplio rango de huésped que incluye miembros de Beta, Gamma y Deltaproteobacterias, con capacidades conjugativas variables¹³³. Estos plásmidos fueron inicialmente descritos como dos grupos de incompatibilidad independientes, IncA e IncC; hasta que posteriores estudios de exclusión sugirieron agruparlos en lo que hoy se conoce como grupo IncA/C¹³⁴. Actualmente, dentro de este grupo de plásmidos, se han identificado dos variantes: A/C₁, que corresponde al anteriormente denominado IncA con el plásmido RA1 como referente, y la variante A/C₂ correspondiente al plásmido IncC. Dentro de la variante A/C₂, se han definido dos tipos, el A/C₂ tipo 1 y tipo 2, que difieren por acumulación de diversos SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) y múltiples inserciones y deleciones^{125,133}. La terminología y agrupación de estos plásmidos en un mismo grupo de compatibilidad ha generado cierta polémica, dado que estudios recientes de compatibilidad clásica, han demostrado que ambos plásmidos (RA1 (IncA) y pRMH760 (IncC)) son compatibles. Dado que nos encontramos en una era donde la secuenciación es más accesible que la evidencia experimental (demostración de incompatibilidad),

Ambrose *et al.*¹³⁵ recomiendan nombrar los dos grupos RepA o RepC, evitando así la necesidad de pruebas de incompatibilidad.

Estos plásmidos se han visto asociados a multiresistencia, detectándose con distintos genes BLEE (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} infrecuente), AmpC (*bla*_{CMY}, *bla*_{DHA}), carbapenemasas (*bla*_{OXA}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}) y otros genes de resistencia como, sulfamidas (*sul1*, *sul2*), aminoglucósidos (*aphA1*, *aadA*, *aadB*, *strA*, *strB*, *aacC*), tetraciclinas *tet(A)*, cloranfenicol (*floR*, *catA1*) y trimetoprim (*dfra*) (Fig. 18)

1.6.5. Plásmidos IncHI

IncHI es un grupo de plásmidos de bajo número de copias, conjugativos, con tamaños muy variables que pueden ir de 75 a 400 Kb, y con un amplio rango de huésped, incluyendo *Enterobacteriaceae* y varios patógenos gramnegativos de peces como *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri*¹³⁶.

Estos plásmidos se dividen en cinco grupos, del HI1 al HI5, aunque los últimos tres no son frecuentes^{137,138}. Los plásmidos HI1 (arquetipo R27, aislado en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium)¹³⁹ y HI2 (arquetipo R478, aislado en *Serratia marcescens*)¹⁴⁰ presentan múltiples replicones; el replicón RepHI1A es común en ambos plásmidos y es el responsable de su incompatibilidad; RepHI1B es propio de plásmidos HI1, pero adicionalmente presentan un replicón RepFIA-like que les confiere incompatibilidad con plásmidos IncF; y por último, RepHI2 que es propio de los plásmidos HI2⁸².

Los plásmidos HI se transfieren con mayor frecuencia a temperatura ambiente ($\geq 27^{\circ}\text{C}$) que a temperatura *in vivo* (37°C); es por esto que son considerados vehículos potenciales en la diseminación de resistencia a antibióticos en ambientes de suelo y agua, además de ser frecuentes en *S. enterica* serovar Typhi, bacteria de transmisión por agua contaminada^{139,141}.

Son varias las resistencias a antibióticos que se han visto asociadas a estos plásmidos, como a betalactámicos, sulfamidas, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y

streptomicina (Fig. 18). Algunos de los genes asociados con mayor frecuencia son *bla_{IMP}*, *bla_{CTX-M}*, específicamente, *bla_{CTX-M-9}* en plásmidos HI2, *bla_{NDM-1}* y más recientemente, los genes *mcr-1* y *mcr-3* en plásmidos HI2 y *mcr-1* en HI1^{125,142,143}.

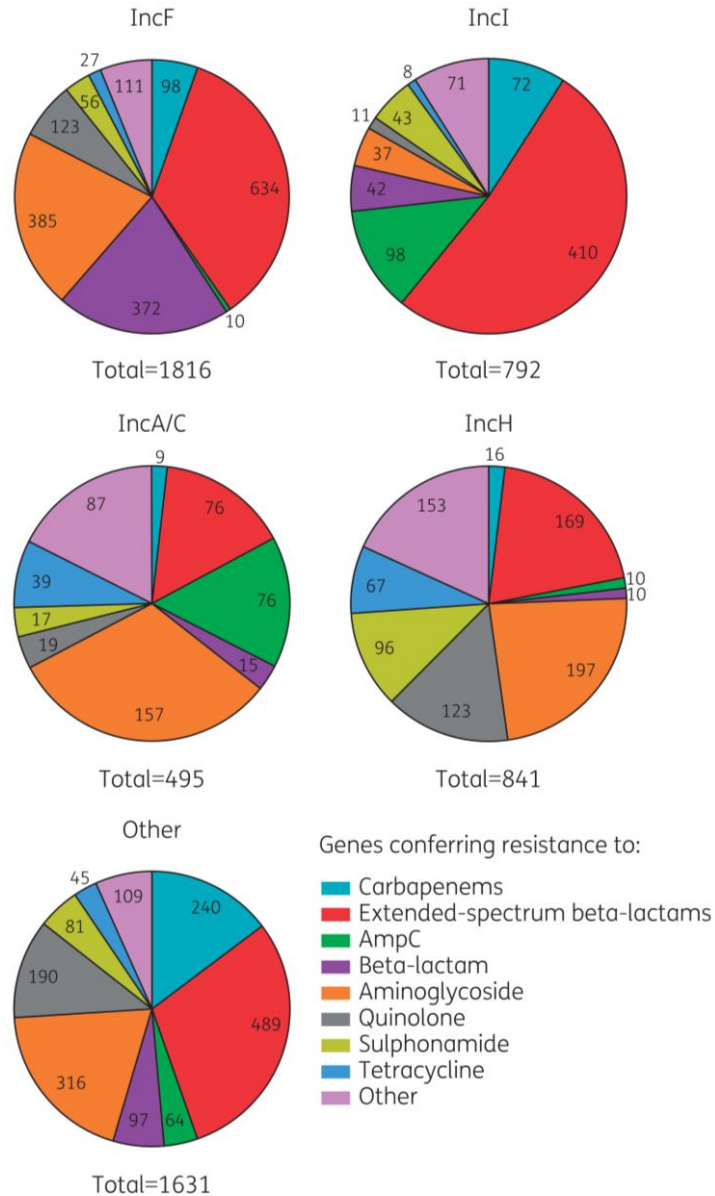


Figura 18. Distribución de genes que codifican resistencia a diferentes clases de antimicrobianos asociados a plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad. El grupo "otro" incluye genes que codifican resistencia a: trimetoprim, cloranfenicol, florfenicol, colistina, fosfomicina. Imagen adaptada de Rozwandowicz *et al.*¹²⁵.

1.7. Subtipificación plasmídica

Con el objetivo de aumentar el poder discriminativo en la caracterización de plásmidos y definir relaciones epidemiológicas y evolutivas, se desarrolló la subtipificación denominada *plasmid Multilocus sequence typing* (pMLST). Se trata de una herramienta que permite diferenciar plásmidos dentro de un mismo grupo de incompatibilidad; asignándoles una secuencia tipo (ST) en analogía a lo que se realiza con el MLST de cepa. El pMLST, facilita la comparación de estudios entre laboratorios, identificando plásmidos similares en bacterias de diferentes fuentes y/o países, y definiendo la epidemiología de plásmidos portadores de genes de resistencia a antimicrobianos^{125,144}.

Actualmente, este método se encuentra disponible para la subtipificación de algunos de los plásmidos portadores de resistencias de mayor prevalencia en la familia *Enterobacteriaceae* como, IncF¹²⁶, IncI1¹⁴⁴, IncN¹⁴⁵, A/C¹³⁴, IncHI1¹⁴¹ e IncHI2¹⁴⁶ (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

1.7.1. *Replicon sequence typing* (RST)

La estructura mosaica de los plásmidos IncF, dificulta la aplicación de un análisis clásico por MLST. Los genes principales utilizados para el tipado pueden ser variables en cada plásmido debido a su estado multireplicón, por lo que no se encuentran presentes en todos ellos; pueden perderse o bien adquirirse como consecuencia de la fusión de los distintos replicones al plásmido¹²⁶.

Dado que son una familia de plásmidos importante en la difusión de genes de resistencia, en 2010, Villa *et al.* diseñaron el método de tipificación de secuencia de replicón del inglés *Replicon sequence typing* (RST). Este consiste en la asignación de un alelo por cada replicón de esta familia presente en un único plásmido y la posterior generación de la denominada fórmula FAB. Esta fórmula indica el tipo de replicones que contiene el plásmido y el alelo asignado a cada uno de ellos, en analogía a lo que sería la secuencia tipo¹²⁶. De este modo, si tenemos un plásmido

con un replicón FII de alelo 2 y otro FIB de alelo 1, la fórmula FAB correspondiente a este plásmido sería, F2:A-:B1, donde A- indica la ausencia de replicón FIA. De igual modo, si tenemos un plásmido con replicón FIIK, FIIS o FIYY, específicos de especie, la fórmula FAB sería K+:A-:B-, S+:A-:B-, Y+:A-:B-, respectivamente.

La región génica utilizada para la asignación alélica en cada uno de los distintos replicones F es (Fig. 19) (<http://pubmlst.org/plasmid/>):

- Región que comprende los iterones y el gen *repE* de la proteína de replicación del replicón FIA
- Gen *repB* de la proteína de replicación del replicón FIB
- Región *copA* (ARN antisentido) de los replicones FII, FIIC, FIIK, FIIS y FIYY

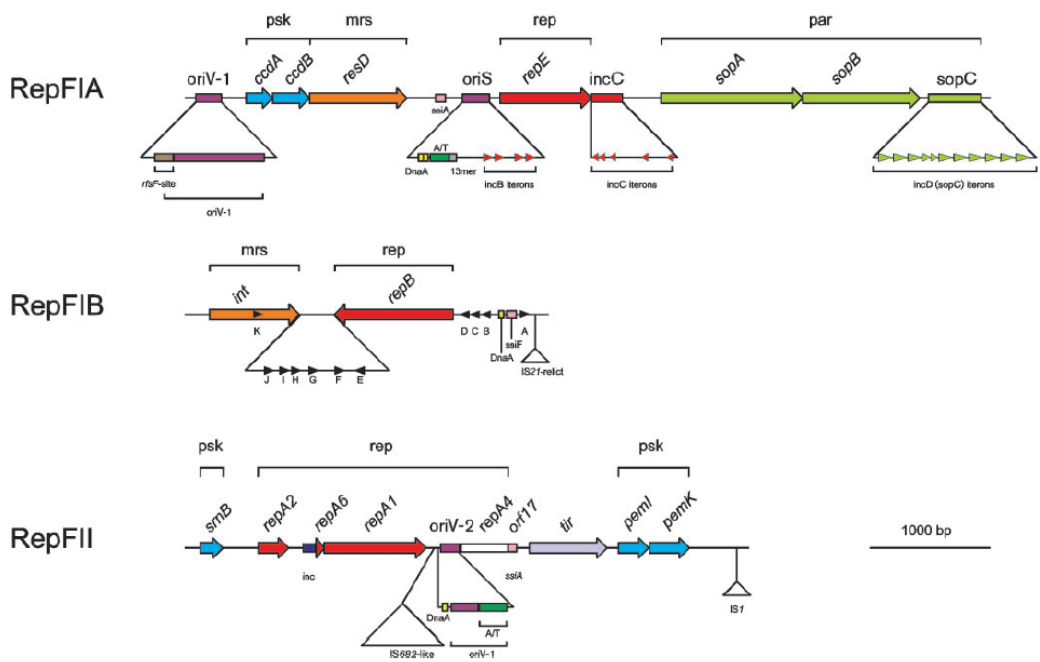


Figura 19. Replicones, FIA, FIB y FII presentes en el plásmido pRSB107. En rojo, los genes para el inicio de la replicación (*rep*); en naranja, genes de resolución multimérica (*mrs*); en azul, genes de muerte postsegregacional (*psk*); y en verde, genes del sistema de particionamiento activo (*par*). Como motivos reguladores tenemos: lugar de resolución de dímeros (sitio *rfsF*, marrón), orígenes de replicación (*oriV*, lila), lugar de unión a DnaA (DnaA, amarillo), región rica en AT (A/T, verde oscuro), repeticiones de

iterón (*incB*, *incC*, rojo; *sopC/incD*, verde claro; A-K, negro), ARN antisentido/*copA* (*inc*, azul oscuro). Los triángulos negros indican inserciones de elementos IS. Imagen adaptada de Szczepanowski *et al.*¹⁴⁷.

Actualmente, se han depositado un total de 1.958 plásmidos de distintas fuentes, especies y regiones en la base de datos de pMLST (Junio de 2020) (<http://pubmlst.org/plasmid/>). De estos, 702 (36%) son plásmidos F y el 18,3% codifican genes de betalactamasas (Fig. 20), y se asignan a 74 FAB fórmulas distintas. *bla*_{CTX-M-15} es el gen mayoritario y como se observa, no se limita a una única fórmula FAB.

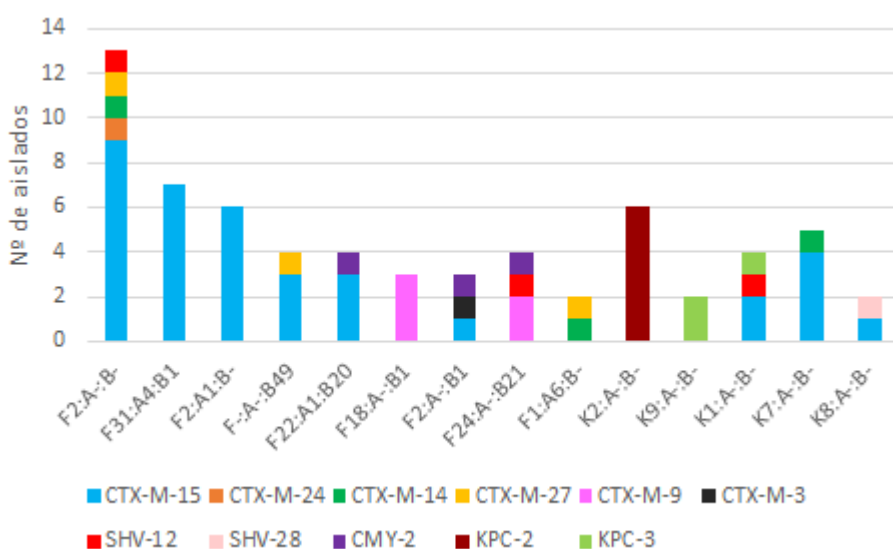


Figura 20. Distribución de las principales FAB formulas (plásmidos IncF) en asociación con genes de betalactamasas. Datos de <http://pubmlst.org/plasmid/>.

1.7.2. Plasmid Multilocus sequence typing (pMLST)

El método pMLST (tipificación de secuencia de plásmidos multilocus) propiamente dicho, se ha desarrollado para la subtipificación de 4 grupos de incompatibilidad plasmídica: Inc11, IncN, IncH11 e IncA/C (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

a) Plásmidos Incl1

Se basa en la variación alélica de cuatro regiones conservadas que incluyen: *pill* del *cluster* de genes para la biogénesis de pilus tipo IV; *sogS*, una primasa que actúa en la replicación de ADN del plásmido; *ardA*, que codifica una enzima antirestricción de tipo I; *trbA*, involucrado en la transferencia y mantenimiento del plásmido; y *repl*, replica¹⁴⁴ (Fig. 21).

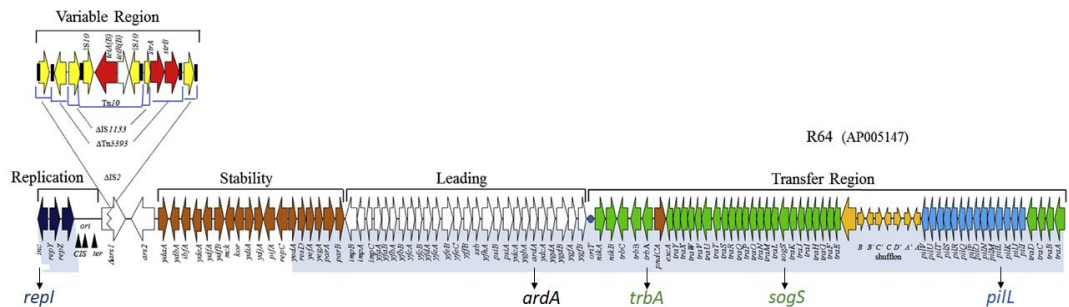


Figura 21. Mapa esquemático del plásmido prototipo Incl1 R64. Las flechas representan los distintos genes y clusters del plásmido y su dirección de transcripción. En verde, se representan los genes de transferencia *trb/tra*; en azul claro, el cluster del pili de tipo IV; en azul oscuro, el replicón; en rojo, genes de resistencia; en amarillo, genes relacionados con transposones y secuencias de inserción; en marrón, genes de estabilización; en blanco, otros genes. En la parte inferior se muestra la localización de los genes utilizados como diana en pMLST. Imagen adaptada de Carattoli 2018¹²⁸.

De los datos introducidos en la base de datos del pMLST, un 42,8% (838/1959) corresponden a plásmidos Incl1. De estos, un 73,1% son portadores de genes de resistencia a betalactámicos y se asignan a 190 ST distintos. Los ST mayoritarios son el ST12, ST7, ST3, ST36, ST31 y ST2, todos ellos asociados principalmente a un solo gen; el ST12 y el ST2 a *bla_{CMY-2}*, el ST7 y ST3 a *bla_{CTX-M-1}*, el ST36 a *bla_{TEM-52}* y el ST31 a *bla_{CTX-M-15}* (Fig. 22).

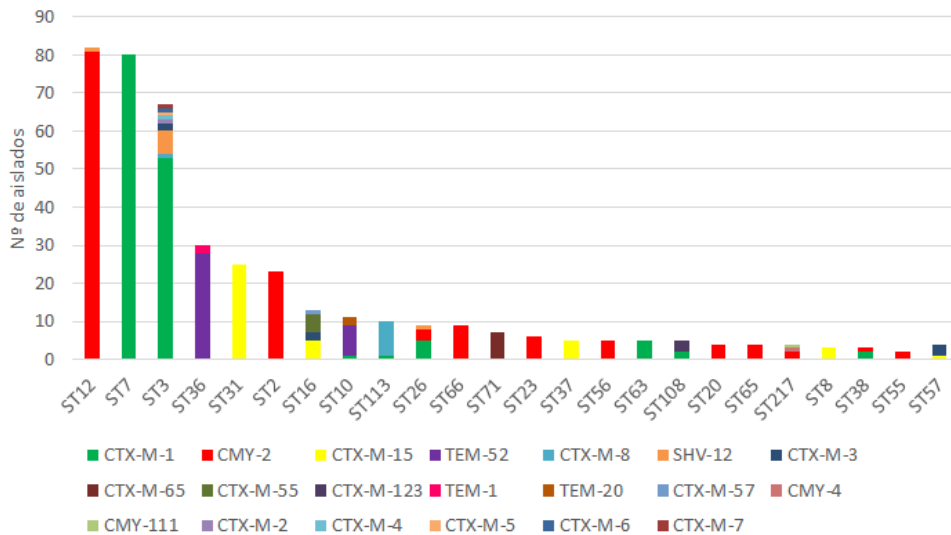


Figura 22. Distribución de los principales ST de IncI1 y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos. La mayoría de los plásmidos son de procedencia humana o animal y *E. coli* es la especie bacteriana de mayor frecuencia. Datos de <http://pubmlst.org/plasmid/>.

b) Plásmidos IncN

En 2011, García-Fernández *et al.*¹⁴⁵ desarrollaron el pMLST para la subtipificación de plásmidos IncN. El tipado consiste en la variación alélica de tres regiones conservadas que incluye: el gen *repN*, que codifica para una replicasa; *traJ*, involucrado en la movilización del plásmido durante la conjugación; y *korA*, encargado de la regulación negativa de la síntesis del pilus y poro conjugativo (Fig. 23).

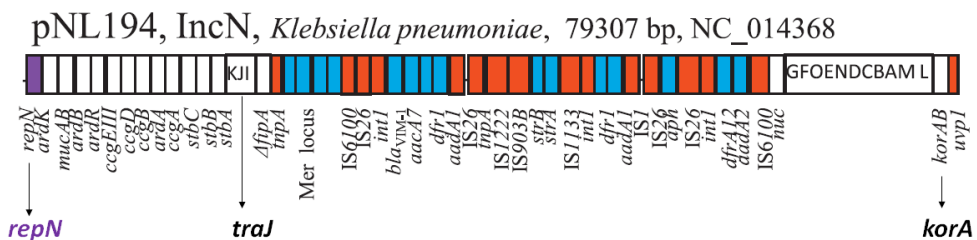


Figura 23. Principales características estructurales del plásmido IncN pNL197. Las cajas blancas indican marcos de lectura abiertos, que codifican funciones básicas. El locus Tra se indica con letras mayúsculas, cada una hace referencia al gen *tra* respectivo (ej. J, *traJ*). En azul se muestran los genes de resistencia;

en naranja, genes relacionados con transposones, integrones de clase 1 y secuencias de inserción; en lila, genes de replicación. En la parte inferior se indican los genes utilizados para el pMLST. Imagen adaptada de Carattoli 2013¹⁴³.

Según la base de datos del pMLST, 130 (6,6%) plásmidos corresponden al grupo IncN. De estos, se listan 101 asociados a genes de resistencia a betalactámicos, distribuidos en 17 ST distintos. Los ST mayoritarios son el ST1 y el ST11, y ambos se encuentran asociados, principalmente, a los genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{VIM-1} (Fig. 24).

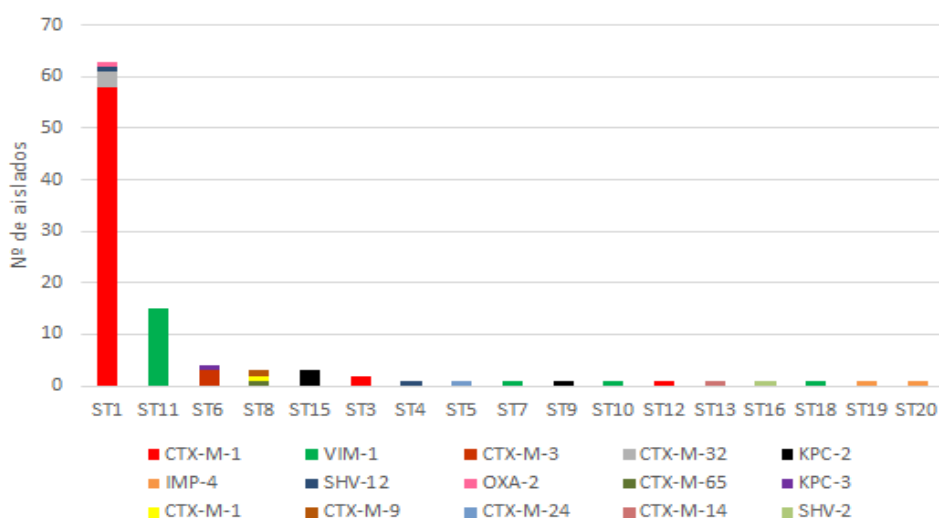


Figura 24. Distribución de los principales ST de IncN y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos. La mayoría de los plásmidos son de procedencia humana o animal y la especie bacteriana de mayor aislamiento *E. coli*. Datos de <http://pubmlst.org/plasmid/>.

c) Plásmidos IncHI1

El pMLST de los plásmidos IncHI1 desarrollado por Phan *et al.*¹⁴¹ en 2009, incluye seis loci: HCM1.043, HCM1.116 y HCM1.259, proteínas hipotéticas pero conservadas en todos los plásmidos HI1; HCM1.064, proteína de inicio de replicación RepHI1A; HCM1.099, gen *trhW*, esencial para la producción del pilus H; y HCM1.178ac, proteína de unión a ADN (Fig. 25).

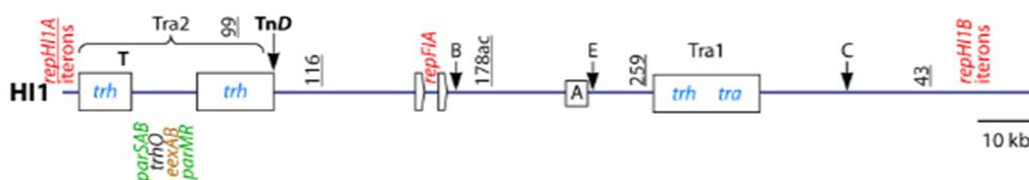


Figura 25. Organización de las regiones troncales de los plásmidos IncHI1. En rojo, se muestran genes involucrados con la replicación; en azul, con la conjugación; en verde, con el mantenimiento. El origen de transferencia (*oriT*) se indica con una "T". Las dianas para el pMLST se muestran subrayadas. Imagen adaptada de Partridge 2018⁸².

A pesar de que el pMLST para este plásmido se describió en 2009, solo se han introducido 50 (2,5%) plásmidos en la base de datos, con última fecha de 2016. Y de estos, solo seis están asociados con genes de resistencia a betalactámicos (dos ST9 asociados a *bla*_{CTX-M-1}, un ST14 a *bla*_{TEM-1}, dos ST15 a *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{CMY-2}, y un ST12 a *bla*_{NDM-1}).

d) Plásmidos A/C

El pMLST para los plásmidos A/C fue desarrollado por Hancock *et al.*¹³⁴ en 2017. Este método utiliza cuatro regiones conservadas dedicadas a la replicación y mantenimiento de estos plásmidos: el gen *repA*, proteína de replicación; los genes *parA*, *parB* y la proteína hipotética de unión a ADN 053, que forman parte del sistema de partición, esencial para la estabilidad y mantenimiento del plásmido en posteriores generaciones (Fig. 26).

Además, para proporcionar una tipificación de mayor resolución aplicable a los datos de secuenciación, también se ha desarrollado un pMLST del *core genoma* (cgPMLST), pasando de cuatro a 28 genes conservados. Tanto el pMLST como el cgPMLST son capaces de distinguir entre los plásmidos A/C₂ de tipo 1 y 2¹³⁴.

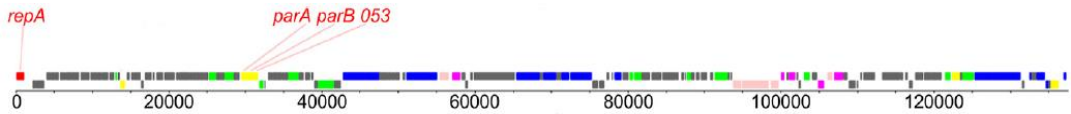


Figura 26. Localización de los distintos genes utilizados para el pMLST de los plásmidos A/C. Imagen adaptada de Hancock *et al.* 2017¹³⁴.

Actualmente, en la base de datos de pMLST hay un total de 82 (4,2%) plásmidos con ST. De estos, 59 son portadores de algún gen de resistencia a betalactámicos, distribuidos en cinco ST distintos (Fig. 27). Estos plásmidos están asociados con multiresistencia; en la base de datos, la mayoría de ellos son portadores de más de un gen de resistencia siendo, los más prevalentes, los genes *bla*_{NDM-1} y *bla*_{CMY-2}.

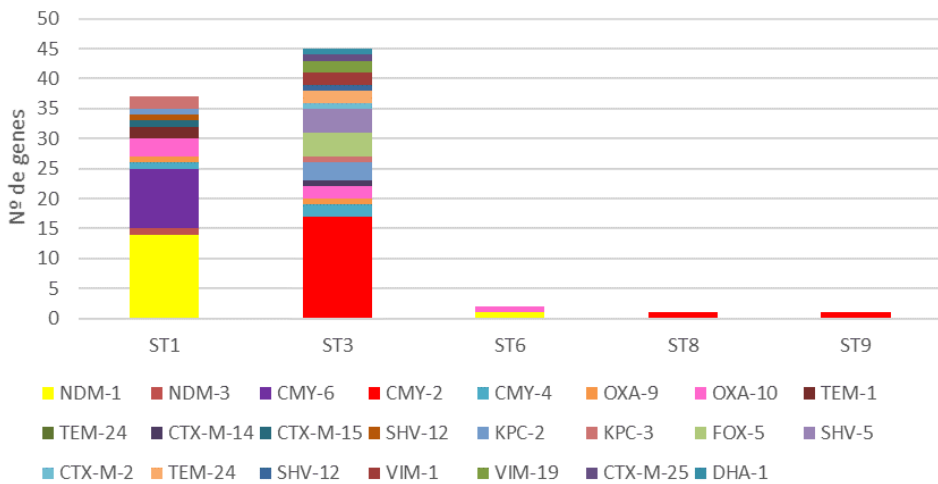


Figura 27. Distribución de los principales ST de plásmidos A/C y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos. La mayoría de los plásmidos son de procedencia humana o animal y la especie bacteriana de mayor aislamiento *E. coli*. Datos de <http://pubmlst.org/plasmid/>.

1.7.3. Double locus sequence typing (DLST)

La subtipificación de los plásmidos InCHI2 se realiza mediante la subtipificación de secuencia de doble *locus*, del inglés *double locus sequence typing* (DLST), ya que solo

incluye dos dianas¹⁴⁶: el gen *smr0018*, que codifica para una proteína hipotética de exclusión de superficie y el gen *smr0199*, que codifica para una proteína de biogénesis del pilus (Fig. 28).

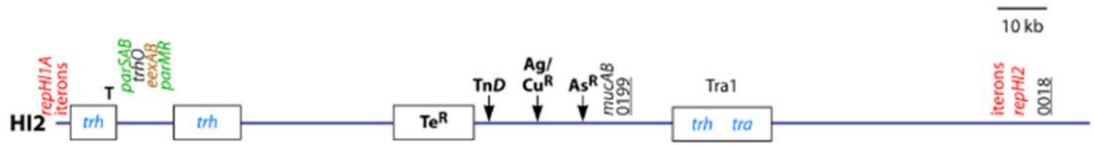


Figura 28. Organización de las regiones troncales de los plásmidos IncHI2. En rojo, se muestran genes involucrados con la replicación; en azul, con la conjugación; en verde, con el mantenimiento. El origen de transferencia (*oriT*) se indica con una "T". Las dianas para el pDLST se muestran subrayadas. Imagen extraída de Partridge 2018⁸².

Hasta el momento, 48 (2,5%) plásmidos IncHI2 han sido reportados en la base de datos del pMLST, 28 de los cuales están asociados con genes de resistencia a betalactámicos (Fig. 29). Estos plásmidos proceden de diversas especies bacterianas como, *E. coli*, *K. pneumoniae* y distintas especies de *Salmonella* y *Enterobacter*; aisladas tanto de humanos como animales.

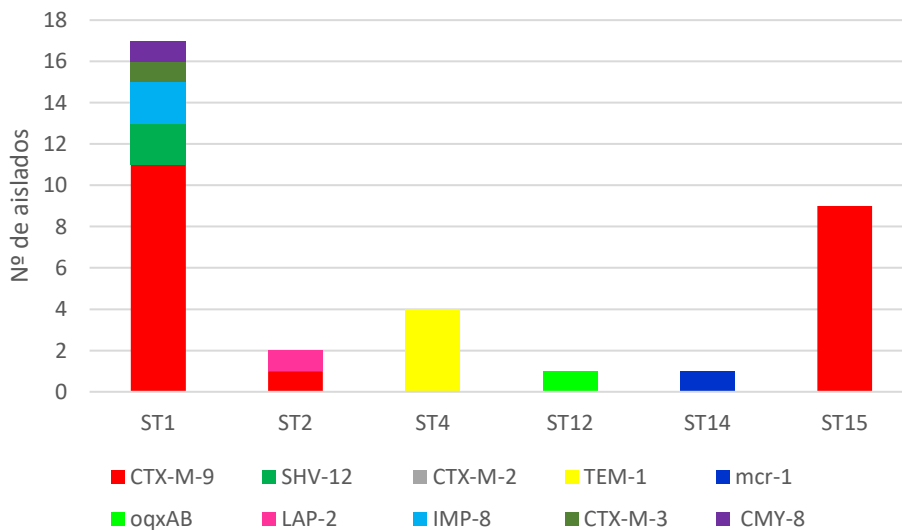


Figura 29. Distribución de los principales ST de IncHI2 y su asociación con genes de resistencia a betalactámicos. La mayoría de los plásmidos son de procedencia humana o animal y la especie bacteriana de mayor aislamiento *E. coli*. Datos de <http://pubmlst.org/plasmid/>.

2. OBJETIVO

Actualmente, el estudio de plásmidos se concentra alrededor de las resistencias a antimicrobianos. Existe un amplio conocimiento de la composición molecular de plásmidos portadores de genes de resistencia, su distribución y diseminación a nivel mundial, su rango de huésped bacteriano, las fuentes donde estos plásmidos son más prevalentes, su importancia y posible problemática en el ámbito clínico y todo aquel ámbito en que la presencia de resistencias pueda suponer un riesgo para la salud humana.

El sesgo inicial de selección de plásmidos por ser portadores de genes de resistencia, podría difuminar la prevalencia real de cada tipo de plásmido en las bacterias, además de enmascarar cualquier otro nuevo tipo de plásmido no relevante por su carencia de genes de resistencia.

Aunque cada vez hay más interés, actualmente, la información existente sobre plásmidos presentes en cepas aisladas de individuos sanos sin la selección sesgada de bacterias resistentes a antimicrobianos, sigue siendo limitada. Por este motivo, el objetivo principal de este estudio es:

Comparar los plásmidos presentes tanto en *Escherichia coli* como en *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras fecales de humanos sanos, con aquellos obtenidos de cepas de pacientes con bacteriemia. El propósito, es proporcionar una mayor comprensión de la aparición de determinados plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica en ámbitos clínicos, haciendo primero un estudio extenso de los plásmidos presentes actualmente en la microbiota comensal humana.

Objetivos específicos:

I. Resistencia a betalactámicos:

- Determinar la prevalencia de portadores sanos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas.
- Caracterizar BLEE, AmpC y carbapenemasas de cepas aisladas de individuos sanos y de cepas bacteriémicas.

II. Estudio de plásmidos de ambas especies y poblaciones:

- Conocer la prevalencia de cada grupo plasmídico mediante PBRT y compararlo entre poblaciones y especies.
- Conocer los subtipos plasmídicos de aquellos plásmidos con pMLST definido (Inc1, IncN).
- Definir la fórmula FAB de cada plásmido IncF.
- Conocer la localización plasmídica o cromosómica de los genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas.
- Establecer las diferencias entre los tipos y subtipos de plásmidos aislados de individuos sanos y pacientes.

III. Estudio de otras características de las cepas de *E. coli*.

- Conocer los grupos filogenéticos de las cepas de *E. coli* circulando tanto en la población sana como en las cepas bacteriémicas y detectar diferencias entre ambas poblaciones
- Relacionar grupos filogenéticos y factores de virulencia con los plásmidos detectados en ambas poblaciones

3. HIPÓTESIS

Hoy en día, conocemos que la expansión de un determinado gen de resistencia en un área determinada, no siempre se debe a la prevalencia de un clon bacteriano concreto. Sino que la presencia de elementos genéticos móviles juega un papel clave en la difusión de prácticamente la mayoría de resistencias antibióticas de relevancia clínica; y los plásmidos, son el elemento genético con mayor potencial para ello.

Aun así, es cierto que sigue habiendo muchos interrogantes abiertos dado que existe una gran variabilidad de plásmidos distintos en función del grupo de incompatibilidad. Además, en el caso de plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad, parece existir una gran diversidad debido a su gran plasticidad para adquirir y/o perder genes por vías distintas.

En este contexto, la hipótesis planteada es que los plásmidos circulantes en la población bacteriana de individuos sanos, sin el sesgo de selección por resistencias antimicrobianas, serán más diversos o distintos, en su mayoría, a los plásmidos de cepas causantes de infección, aun siendo del mismo grupo de incompatibilidad. Así, la adquisición de genes de resistencia por un plásmido determinado, puede favorecer una expansión del plásmido en cuestión y por lo tanto encontrarse en mayor proporción en ecosistemas bajo presión selectiva (como el hospitalario).

4. Materiales y Métodos

A decorative orange scribble consisting of several overlapping, curved lines that partially obscures the text 'Métodos'.

4.1. Muestras y ámbito de estudio

Este trabajo se basa en un estudio multicéntrico de carácter prospectivo que forma parte de un proyecto FIS (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, PI13/00329), y va dirigido a la epidemiología de plásmidos y su distribución entre dos poblaciones distintas. En él, han participado los Departamentos de Microbiología de tres centros hospitalarios de la ciudad de Barcelona y de una universidad: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital de la Vall d'Hebrón, Hospital Clínic de Barcelona, y la Universidad de Barcelona.

Para la realización de este estudio, se analizaron dos poblaciones de cepas. En primer lugar, se recolectaron un total de 150 muestras fecales de individuos sanos sin relación con el ámbito clínico. El muestreo se llevó a cabo durante enero de 2014 y febrero de 2015. Los criterios de inclusión de los participantes fueron: ser mayores de edad y no haber consumido antibióticos, ni haber estado hospitalizados durante los tres meses previos a la recolección de la muestra.

Para la segunda población de estudio, se utilizaron 202 cepas provenientes de hemocultivos positivos de pacientes de los tres hospitales participantes. En este caso, los únicos criterios de inclusión fueron, que la cepa de aislamiento fuera *E. coli* o *K. pneumoniae*, y que fuera una única cepa por paciente. Las cepas se fueron recolectando de forma secuencial, de cada uno de los hospitales, hasta alcanzar el número de cepas preestablecido. Del total de cepas clínicas, 99 correspondían a *E. coli* y 103 a *K. pneumoniae*. El número de cepas provenientes de cada hospital se detalla en el apartado de resultados.

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (13/051/1439) y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes sanos (Anexo I).

4.2. Aislamiento e identificación de *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestra fecal

Para el aislamiento de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* a partir de muestra fecal, se realizaron tres siembras simultáneas en tres medios de cultivo distintos. Dos de ellos, ChromID ESBL (BioMerieux®) y CCDA (*Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*, BioMerieux®), se utilizaron con el fin de determinar la prevalencia de portadores de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas en individuos sanos, ya que se trata de medios con betalactámicos incorporados. El tercer medio, agar McConkey (BioMerieux®), sumado a los dos anteriores, se utilizaron para el estudio epidemiológico de plásmidos (Fig. 30). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 – 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se hizo una resiembra, seleccionando morfologías de colonia distinta de estas placas, a medio selectivo/diferencial CPSE (chromID® CPS® Elite agar, BioMerieux®) para hacer una primera identificación aproximada, dado que el objetivo era aislar tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* (Fig. 30). Las placas de CPSE se incubaron a 37°C durante 18 – 24 horas.

Tras el aislamiento en CPSE, se procedió a la identificación de cada uno de los aislados obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*, Bruker, Estados Unidos) (Fig. 30). Una vez identificadas como *E. coli* o *K. pneumoniae*, se recogió el cultivo puro de la misma placa de identificación con un asa bacteriológica estéril para introducirlo en un tubo con medio de congelación para su crioconservación a -20°C (por duplicado).

La identificación de las cepas clínicas se realizó en los hospitales de origen y, posteriormente, fueron enviadas al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

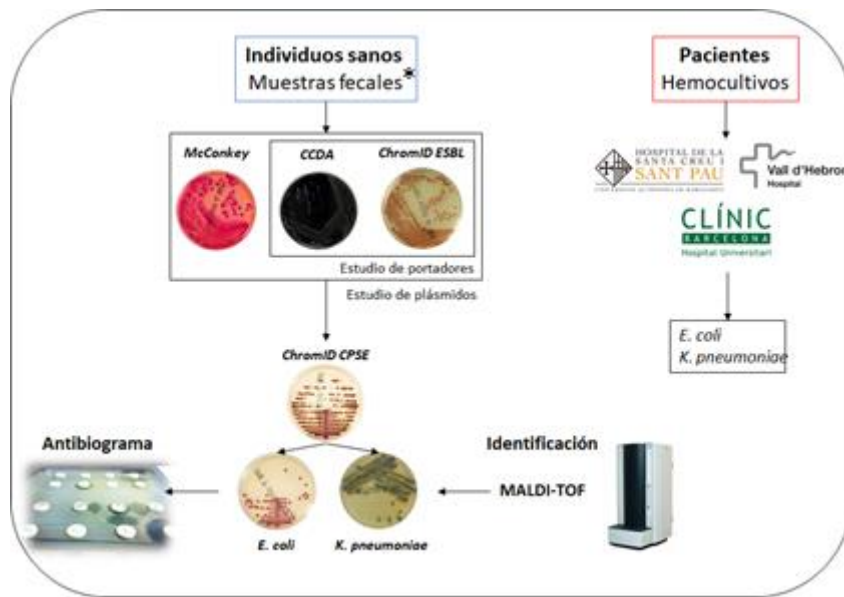


Figura 30. Flujo de trabajo para el aislamiento e identificación de las cepas del estudio.

*Las muestras fecales de voluntarios sanos fueron recolectadas por miembros del grupo de investigación de microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y miembros del departamento de genética, microbiología y estadística de la Universidad de Barcelona.

4.3. Estudio de sensibilidad antibiótica

Para el estudio de sensibilidad antibiótica, se utilizó el método de disco difusión en medio de cultivo Mueller-Hinton (BioMeriux). Para la preparación del inóculo, se utilizó el método de suspensión directa de colonia. Todos los aislados de muestra fecal identificados como *E. coli* o *K. pneumoniae*, fueron sembrados en placas de agar sangre que se incubaron a 37°C durante 18h. Una vez pasado el tiempo de incubación, se picaron varias colonias con un asa estéril y se resuspendieron en suero fisiológico, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Posteriormente se sumergió un escobillón en la suspensión y se hizo una siembra uniforme en una placa de Mueller-Hinton cuadrada de 120x120 mm y otra redonda de 90 mm (BioMeriux). Los discos de antibiótico se colocaron en las placas mediante un dispensador. La disposición de los discos en las placas cuadradas, se realizó de tal forma que nos permitiera ver el efecto sinérgico

producido entre las cefalosporinas de amplio espectro o los monobactámicos y el ácido clavulánico en presencia de cepas productoras de BLEE (Fig. 31); y por otro lado, el efecto antagónico producido en cepas con AmpC inducibles al aproximar un betalactámico inductor débil (cefotaxima, ceftazidima, aztreonam) con un betalactámico inductor fuerte (imipenem, ceftazidima) (Fig. 31). Este último efecto es útil para la detección de AmpC adquiridas en *E. coli*, dado que un resultado de antagonismo descartaría que el fenotipo AmpC se diera como resultado de la hiperproducción de su AmpC cromosómica, la cual no es inducible. La gentamicina, amikacina y tobramicina también fueron testados.

Para la interpretación de los halos de inhibición se siguieron los criterios establecidos por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015*), descritos en la Tabla 5.

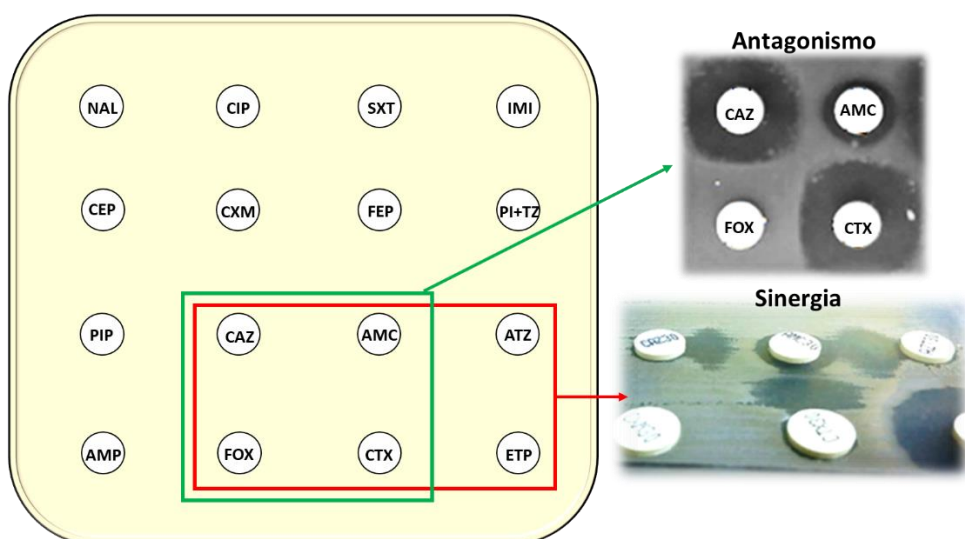


Figura 31. Disposición de los discos de antibiótico en las placas de Mueller-Hinton. Rojo: discos que aparecen en la imagen inferior de la derecha, donde se observa el efecto sinérgico que se produce entre los discos de ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) y aztreonam (ATZ) con el disco central de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC). Verde: discos que aparecen en la imagen superior de la derecha, donde se observa el efecto antagónico que se produce entre el disco de ceftazidima (CAZ) y los de ceftaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ). NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; SXT, co-trimoxazol; IMI, imipenem; CEP, cefalotina; CXM, cefuroxima; FEP, cefepima; PI+ TZ, piperacilina-tazobactam; PIP, piperacilina; AMP, ampicilina; ETP, ertapenem.

Tabla 5. Antimicrobianos testados por disco difusión y puntos de corte según CLSI.

Antimicrobiano	Contenido del disco (μg)	Halo de inhibición (mm)		
		R	I	S
Ampicilina	10	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Amoxicilina-ácido clavulánico	30	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Piperacilina	100	≤ 17	18 - 20	≥ 21
Cefalotina	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefuroxima	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefoxitina	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Cefotaxima	30	≤ 22	23 - 25	≥ 26
Ceftazidima	30	≤ 17	18 - 20	≥ 21
Cefepima	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Aztreonam	30	≤ 17	18 - 20	≥ 21
Imipenem	10	≤ 19	20-22	≥ 23
Ertapenem	10	≤ 18	19 - 21	≥ 22
Gentamicina	10	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Tobramicina	10	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Amikacina	30	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Ácido nalidíxico	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Cotrimoxazol	23,75/1,25	≤ 10	11-15	≥ 16

R, resistente; I, intermedio; S, sensible

Para la identificación de genes BLEE, AmpC o carbapenemasas mediante PCR (apartado 4.4), se seleccionaron aquellas cepas con los siguientes perfiles de sensibilidad¹⁴⁸:

- BLEE: cepas resistentes a AMP, CEP y CTX, CAZ y/o ATM
- AmpC: cepas resistentes a AMP, CEP y AMC y/o FOX

- Carbapenemasas: cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a ETP e IMI

Por último, para identificar aquellas cepas con perfiles de multirresistencia, del inglés *Multi-drug resistance* (MDR), se siguieron los criterios de Magiorakos *et al.*¹⁴⁹ Por lo tanto, aquellas cepas resistentes a ≥ 1 agentes antimicrobianos de ≥ 3 de las categorías antimicrobianas fueron consideradas MDR. Estas categorías en la familia *Enterobacteriaceae* son: aminoglucósidos, penicilinas antipseudomonales más inhibidores de betalactamasas, carbapenémicos, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, cefamicinas, fluoroquinolonas, inhibidores de la vía del folato, gliciliclinas, monobactámicos, penicilinas, penicilinas más inhibidores de betalactamasas, fenicoles, ácidos fosfónicos, polimixinas y tetraciclinas¹⁴⁹.

4.4. Metodología para protocolos donde se requiere de ADN genómico

4.4.1. Extracción y cuantificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, se utilizó el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA de Sigma-Aldrich (Estados Unidos). Se partió de una colonia crecida en agar sangre con el posterior cultivo O/N en caldo de cultivo LB (Luria-Bertani) a 37°C y en agitación suave. Posteriormente, se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante para la extracción en columna del ADN. El protocolo se describe en el Anexo II, Protocolo 1. Este procedimiento se llevó a cabo en el total de las cepas, tanto de *E. coli* como de *K. pneumoniae*.

La cuantificación del ADN extraído (ng/ μ l) se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTek (Estados Unidos) y el *software* Gen5. Para ello se empleó una placa para Micro-Volúmenes Take3™, la cual permite la lectura de 16 muestras. En cada *spot* de la placa se depositaron 2 μ l (por duplicado) de cada muestra a medir y se ajustó el programa para la lectura de ADN de doble cadena a una absorbancia de 260nm. La cuantificación se utiliza para

determinar si la concentración de ADN obtenida en la extracción es suficiente o insuficiente para los siguientes protocolos. De este modo si hay exceso de ADN es preciso, diluir las muestras. En el caso de que este sea insuficiente, se repite la extracción.

4.4.2. Amplificación de ADN mediante PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue desarrollada por Kary Mullis y colaboradores en 1980, trabajo por el que fue reconocido con un premio Nobel en 1993. Esta técnica se basa en la capacidad de la ADN polimerasa para la síntesis *in vitro* de nuevas cadenas de ADN complementario a partir de un molde de aquello que se quiera amplificar¹⁵⁰. Para el desarrollo de esta técnica se requiere de cuatro componentes principales (Fig. 32):

- **Iniciadores o cebadores:** consisten en secuencias cortas de oligonucleótidos específicas para la región que se pretende amplificar. Para ello, se requiere de dos iniciadores para cada reacción, de forma que ambos queden posicionados flanqueando la región de interés.
- **ADN polimerasa:** Enzima que se une al extremo 3'-OH del iniciador e inicia la síntesis de la cadena de ADN complementario. La polimerasa usada en estos procedimientos tiene la peculiaridad de ser termoestable. Fue aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria capaz de crecer en aguas termales.
- **Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP):** sustrato requerido por la polimerasa para la elongación de la cadena de ADN en síntesis.
- **Muestra de ADN a amplificar**

La PCR se compone de ciclos repetitivos compuestos por 3 etapas consecutivas que requieren condiciones de temperatura y tiempos de incubación distintos. Esta reacción se logra mediante el uso de un termociclador, en el cual se mantienen las condiciones pertinentes y se realizan cambios rápidos y controlados de la temperatura en las distintas fases del proceso de amplificación. Estas 3 etapas son (Fig. 32):

1. Desnaturalización: separación de las hebras de ADN bicatenario al aplicar una temperatura aproximada de entre 90-94°C.
2. Hibridación: una vez separadas las hebras, se produce un enfriamiento de la muestra, lo que permite la unión específica entre los iniciadores y la cadena de ADN complementario a amplificar. La temperatura en esta etapa depende de las características fisicoquímicas de los iniciadores utilizados.
3. Elongación: la mix se calienta a 72°C, que es la temperatura óptima para la actividad de la Taq polimerasa. Esta se une al extremo 3' del iniciador y cataliza la síntesis de nuevas cadenas de ADN.

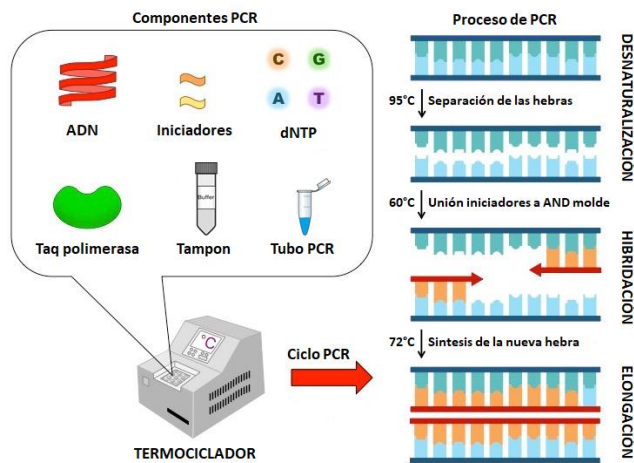


Figura 32. Componentes necesarios para el proceso de un ciclo de PCR

La repetición de estos 3 pasos da como resultado la duplicación del número de copia por cada ciclo. De este modo, la generación de productos de PCR, sigue un patrón exponencial y alcanza una meseta después de aproximadamente 30 a 40 ciclos, cuando la mayoría de los reactivos se han agotado.

La técnica de PCR se ha utilizado para:

- **Caracterización de genes BLEE, AmpC y carbapenemasas:** Todas aquellas cepas con un perfil de sensibilidad afín a la producción de betalactamasas de

tipo BLEE, AmpC y/o carbapenemasas, fueron seleccionadas para la identificación de estos genes mediante PCR y su posterior caracterización mediante secuenciación (apartado 4.4.5).

- **Tipificación plasmídica mediante PBRT:** Para la identificación de los plásmidos de nuestras cepas se utilizó el kit PBRT de Diatheva. El kit utilizado consta de 8 PCR múltiples para la amplificación de 25 replicones representativos de los principales grupos de incompatibilidad plasmídicos y genes replicasa identificados en plásmidos de resistencia circulantes entre la familia *Enterobacteriaceae* (Fig. 33). Además, también se realizaron PCR simples para la identificación de los replicones ColE¹⁵¹, X3 y X4¹⁵² y para la diferenciación de los plásmidos IncL e IncM¹⁵³.

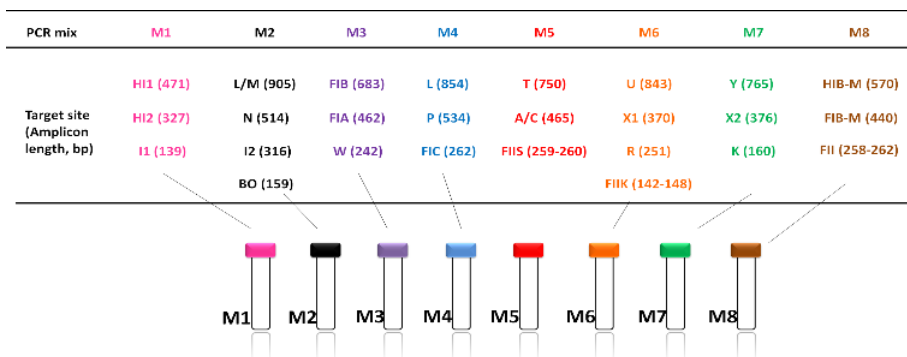


Figura 33. Replicones identificados en cada una de las 8 PCR múltiples del kit PBRT de Diatheva.

- **Subtipificación plasmídica mediante pMLST y RST:** La subtipificación plasmídica, se utiliza para diferenciar entre plásmidos de un mismo grupo de incompatibilidad, además de para establecer relaciones tanto epidemiológicas como evolutivas¹⁴⁴. A partir de los resultados de PBRT, la subtipificación se llevó a cabo en plásmidos IncN e Inc11 mediante *plasmid MultiLocus Sequence Typing* (pMLST)^{144,145} y en plásmidos IncF mediante *Replicon Sequence typing* (RST)¹²⁶.

- **Determinación del grupo filogenético de las cepas de *E. coli*:** La asignación de las cepas de *E. coli* a un grupo filogenético se realizó mediante el método de Clermont *et al.* el cual consiste en una PCR cuádruple²¹. Con este método podemos definir a cuál de los ocho grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I) pertenecen nuestras cepas. Para ello, el primer paso es realizar la PCR cuádruple con la que se determina un genotipo correspondiente a la presencia/ausencia de los cuatro genes necesarios (*arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2). A partir de aquí las cepas de *E. coli* pueden ser asignadas a un grupo filogenético o bien requerir de PCR adicionales para acabar de definir el grupo al que pertenece (Tabla 6).

Tabla 6. Genotipos cuádruples y pasos requeridos para la asignación de grupos filogenéticos

Genotipo cuádruple				Filogrupo	Siguiete paso
<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	
+	-	+	-	A o C	PCR grupo C
+	+	-	-	D o E	PCR grupo E
+	+	-	+	D o E	PCR grupo E
+	+	+	-	E o clado I	PCR grupo E

Tabla adaptada de Clermont *et al.* 2013²¹

- **Detección de factores de virulencia en las cepas de *E. coli*:** De los múltiples factores de virulencia ya identificados en *E. coli*, se hizo una selección de 15 pertenecientes tanto a adhesinas, sideróforos, toxinas y otros grupos (Tabla 7). Una vez seleccionados, se realizaron las PCR pertinentes.

Tabla 7. Factores de virulencia característicos de *E. coli* patogénicas.

FV	Descripción	Función
Adhesinas		
<i>fimH</i>	Adhesina de fimbrias de tipo 1	Factor de colonización en infecciones extraintestinales, formación de biopelículas.
<i>hra</i>	Aglutinina resistente al calor	-
Sideróforos		
<i>fyuA</i>	Yersiniabactina	Captación de Fe, capacidad de solubilizar Fe unido a proteínas del huésped
<i>iutA</i>	Aerobactina	Precursor del receptor de aerobactina férrica
<i>iron</i>	Salmochelina	Receptor de sideróforos, uso de iones Fe obtenidos del huésped
<i>ireA</i>	Proteína de membrana externa	Receptor de sideróforos, uso de iones Fe obtenidos del huésped
Toxinas		
<i>hlyD</i>	Hemolisina α	Creación de poros en la membrana de células huésped (lisis celular)
<i>hlyF</i>	Hemolisina F	
<i>cnf</i>	Factor citotóxico necrotizante	Participa en la necrosis celular
<i>clbB,N</i>	Colibactina	Produce mutaciones en el ADN de las células del huésped
Otros		
<i>iss</i>	Supervivencia sérica aumentada	Factor de protección contra la fagocitosis
<i>traT</i>	Proteína de transferencia	Inhibición de la vía clásica de la actividad del complemento
<i>ibeA</i>	Invasina	Invasión celular en los tejidos del huésped.
<i>ompT</i>	Proteína de membrana externa	Permite la supervivencia intracelular, evasión de la inmunidad
<i>usp</i>	proteína uropatógena específica	Bacteriocina putativa

Tabla adaptada de Oteo *et al.* 2014¹⁵⁴ y Thomas A. Russo *et al.* 2000¹⁶. FV, factores de virulencia.

- **Síntesis de sondas para el proceso de hibridación:** La síntesis de las sondas se realizó mediante el kit comercial “PCR DIG Probe Synthesis Kit” de Roche. Se trata de un sistema que usa digoxigenina (DIG), un hapteno esteroideo, para el marcaje de sondas de ADN para la hibridación *Southern*. El dUTP marcado (Dig-dUTP) se incorpora en el fragmento de ADN que se quiere utilizar como sonda mediante PCR. Se utilizaron los mismos iniciadores

utilizados para los distintos replicones y genes de resistencia identificados, además de iniciadores para 16S rRNA.

Los iniciadores y condiciones de PCR utilizados en cada proceso se describen en los Protocolos 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6, respectivamente, del Anexo II.

4.4.3. Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa

Todo producto de amplificación fue posteriormente visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica permite la separación de distintas moléculas, en nuestro caso ADN, por su tamaño y carga. Consiste en la aplicación de un campo de corriente continua sobre un gel poroso por el cual las moléculas de interés se desplazarán a distintas velocidades según su tamaño. La tinción del gel se realiza mediante un agente intercalante, como bromuro de etidio (BrEt) o SYBER-green, el cual se une a las moléculas de ADN permitiéndonos visualizar las bandas generadas por la acumulación de estos fragmentos de ADN si lo exponemos a luz UV. Otro elemento importante en esta técnica es el tampón de carga. Este nos permite aumentar la densidad de la muestra facilitando su deposición en el fondo del pocillo del gel de agarosa. Además, tiñe la muestra permitiéndonos identificar la distancia recorrida antes de que la muestra pueda salirse del gel.

En nuestro caso, la realización de esta técnica se hizo por los motivos descritos a continuación:

- El motivo principal de toda electroforesis es el de comprobar que el proceso de PCR ha sido efectivo, es decir, que se ha obtenido producto de amplificación. Además, también se debe corroborar que aquello amplificado corresponde con el tamaño del fragmento génico de interés. Para esto, en el momento de la PCR se añaden dos reacciones de más, el control positivo y el control negativo. El control negativo se añade para descartar posibles contaminaciones. Consta de todos los reactivos necesarios para la PCR a

excepción del ADN, por lo tanto, en el momento de la visualización no se debería observar ninguna banda. El control positivo, por otro lado, se realiza con ADN conocido, el cual sabemos que contiene la región génica que se quiere amplificar. Con este control nos aseguramos de que el proceso de PCR ha funcionado correctamente y, además, que el tamaño de las muestras problema es el correcto.

- La realización de PCR múltiples como en el caso del PBRT, las PCR para la detección de genes AmpC o para la identificación del grupo filogenético de las cepas de *E. coli*, nos permiten tener amplicones de distintas regiones génicas y de distintos tamaños en una misma reacción de PCR. De este modo, gracias a la electroforesis podemos separar estos fragmentos e identificarlos según su tamaño.

El protocolo de electroforesis en gel de agarosa se describe en el Anexo II, Protocolo 3.

4.4.4. Purificación de amplicones para secuenciación

El proceso de purificación se utiliza con el fin de aislar de forma eficiente los productos de PCR de la reacción de amplificación ya que, el exceso de iniciadores, dNTP no incorporados, ADN polimerasa, aceites minerales y sales pueden interferir en reacciones posteriores como la secuenciación. Este proceso se realizó utilizando los kits comerciales de purificación de ADN *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, España) y *ExoSAP-IT PCR purification Clean up Reagent* (ThermoFisher Scientific). Los detalles de ambos métodos se describen en el Anexo II Protocolo 4.

4.4.5. Secuenciación por Sanger y análisis de los resultados

La secuenciación de Sanger o también conocida como secuenciación por terminación de cadena, fue desarrollada por el bioquímico Fred Sanger en 1977. Este método se basa en un proceso de amplificación con la peculiaridad de que, además, se le

añaden dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) marcados, cada uno de ellos, con un fluoróforo de distinto color. Estos nucleótidos, de parada, carecen del grupo 3'-OH, por lo que cuando son incorporados a la secuencia, su elongación se ve interrumpida. De este modo, se generan fragmentos de ADN que difieren en una base de longitud. Posteriormente se realiza una electroforesis capilar, detectando estos fragmentos marcados fluorescentemente de forma ordenada (del más corto al más largo) permitiendo reconstruir toda la secuencia de interés (Fig. 34).

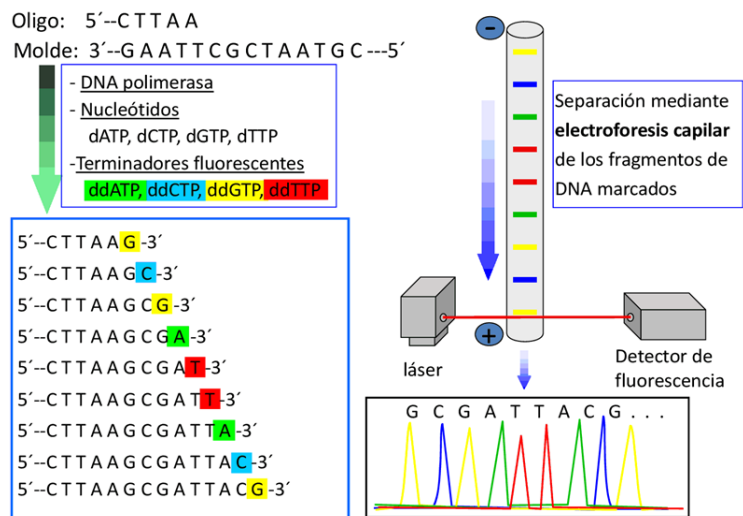


Figura 34. Esquema del proceso de secuenciación de Sanger.

La secuenciación por Sanger fue necesaria para:

- Definir los distintos alelos del pMLST y RST para poder obtener un ST y fórmula FAB, respectivamente.
- Caracterizar los genes BLEE, AmpC y carbapenemasas.

La secuenciación por Sanger de estos genes se realizó siguiendo las indicaciones dadas por MacroGen Inc (Países Bajos), tanto para la preparación de la placa de secuenciación como para el correcto envío de los amplicones ya purificados.

Los resultados de secuenciación se reciben en tres formatos distintos. Se descargaron aquellos archivos con formato AB1, el cual nos permite analizar y editar las secuencias. Para ello se utilizó el programa BioNumerics v7.6 (AppliedMaths. Disponible en <http://www.applied-maths.com/>). Para cada muestra a analizar obtenemos dos secuencias, la directa o *Forward* de dirección 5'-3' y la reversa o *Reverse* de dirección 3'-5'. Estas dos secuencias son ensambladas utilizando el programa, de esta forma se crea un *contig* con una secuencia consenso. Posteriormente, estas secuencias obtenidas son comparadas con una base de datos específica según lo que se quiere analizar:

- En el caso de las secuencias obtenidas por pMLST y RST se lanzaron a la base de datos del pMLST (<https://pubmlst.org/plasmid/>) obteniendo así el alelo correspondiente a cada secuencia y, una vez obtenido el alelo, según la combinación de estos, se obtuvo un ST u otro.
- En el caso de las secuencias para la caracterización de genes de resistencia, se lanzaron a la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

4.5. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) fue descrita por primera vez por Schwartz and Cantor en 1984¹⁵⁵. Esta técnica consiste en la aplicación de un campo eléctrico, en más de una dirección y de forma alterna (pulso), a través de una matriz sólida (gel de agarosa) para lograr una buena separación de fragmentos de ADN de gran tamaño (10MB). Este pulso, promueve la migración de los fragmentos en “zig-zag” a través de los poros del gel. El tiempo requerido por los fragmentos de ADN de diferentes tamaños para reorientarse al nuevo campo eléctrico, es decir, la velocidad de su migración es inversamente proporcional a su peso molecular y, es este factor el que permite la separación y el enfoque de los fragmentos de ADN¹⁵⁶. El equipo utilizado para este proceso fue el

CHEF Mapper de Bio-Rad Laboratories. Este utiliza 24 electrodos dispuestos en forma de hexágono donde el campo eléctrico se cruza en un ángulo de 120° en todas las partes del gel. Esto permite que todas las moléculas de ADN del gel queden bien enfocadas separadas y en carriles rectos.

Uno de los puntos más importantes de esta técnica, es la preservación del ADN procurando que no se produzcan roturas mecánicas ya que, si el ADN se rompe por lugares distintos a los lugares de actuación de las endonucleasas, el patrón de bandas resultante no sería fiable. Por este motivo, la extracción y digestión del ADN se lleva a cabo en bloques de agarosa (insertos) que, además de proteger el ADN de posibles fragmentaciones mecánicas, nos permite conservar todo el contenido genético sin pérdidas durante el proceso de extracción de ADN.

Las principales aplicaciones que presenta esta técnica son:

- Determinar la relación epidemiológica de distintos aislados gracias a la comparación de los patrones de bandas resultantes de una previa digestión con enzimas de restricción y su posterior separación por PFGE.
- Investigar regiones específicas de ADN mediante *Southern blot* e hibridación.
- Separar y conocer el tamaño de plásmidos.

En el presente estudio, esta técnica se ha utilizado para separar y conocer el tamaño de los plásmidos y para investigar regiones específicas del ADN. Dado que los objetivos eran, 1) determinar la localización de los distintos replicones F identificados en cada cepa y así definir si estos se encuentran en un mismo plásmido o en distintos; y 2) determinar la localización plasmídica o cromosómica de los genes de resistencia que codifican para BLEE, AmpC y carbapenemasas identificados en el estudio; las enzimas de restricción utilizadas fueron:

1. Endonucleasa S1: convierte los plásmidos, en todas sus conformaciones, en moléculas lineales de longitud completa. Utilizando esta enzima aseguramos que un único plásmido genere solo una banda en el gel y no más de una por sus diferentes conformaciones¹⁵⁷.

2. Endonucleasa I_{Ceul}: realiza una digestión parcial del genoma bacteriano, uniéndose en las regiones génicas que codifican para rRNA; de este modo, se genera un patrón de bandas concreto para cada especie/genero según el número de repeticiones de este gen¹⁵⁸. La digestión con esta enzima nos permite determinar si la localización de los genes *bla* es cromosómica.

El protocolo de esta técnica se encuentra descrito en el Anexo II Protocolo 5.

Para el cumplimiento de ambos objetivos, tanto los geles S1-PFGE como I_{Ceul}-PFGE requieren de una transferencia a una membrana (Southern blot) y de la hibridación con las sondas pertinentes (descrito en el siguiente punto). En la Figura 35 se muestra un esquema simplificado de todo el proceso, I_{Ceul}/S1-PFGE, *Southern blot* e hibridación.

4.6. *Southern blot* e hibridación

El *Southern blot* y las técnicas de hibridación asociadas fueron descritas por primera vez por E.M. Southern en 1975^{159,160}. Esta técnica consiste en la transferencia de fragmentos de ADN de un gel de electroforesis, en nuestro caso de un PFGE, a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Con esto, se inmovilizan los fragmentos de ADN, por lo que la membrana lleva una reproducción semipermanente del patrón de bandas del gel (Fig. 35). Después de la inmovilización, el ADN puede someterse a un análisis por hibridación, permitiendo identificar bandas con similitud de secuencia con una sonda marcada. En el presente estudio, dado que una misma membrana podía llegar a hibridarse más de cuatro veces, se utilizaron membranas de nylon, material más robusto que permite unas 10 hibridaciones antes de que el ADN revierta su fijación. La transferencia del ADN del gel a la membrana se produce por capilaridad y, con ayuda de una bomba de vacío conectada a una unidad de transferencia, se acelera el proceso de transferencia (Fig. 35).

Algunos aspectos importantes para este proceso son:

- Después del rebelado del PFGE, el gel es secuencialmente tratado con soluciones ácidas y alcalinas. La solución ácida produce la despurinización parcial de los fragmentos de ADN y la alcalina produce la escisión de estos, dando lugar a una reducción en la longitud de los fragmentos que facilitará su posterior transferencia a la membrana de nylon. La solución alcalina también promueve la desnaturalización del ADN, formando moléculas monocatenarias necesarias para el posterior análisis de hibridación. Finalmente, con una solución de neutralización, se pretende reducir el pH del gel a < 9 ya que, a pH más altos, el ADN transferido puede no unirse a la membrana.
- Para el proceso de hibridación se utilizó el DIG *Luminiscent Detection Kit* de Roche. El fundamento del sistema DIG no radioactivo se basa en el uso de digoxigenina, un hapteno esteroideo que se une a los dUDP, UDP o ddUDP para marcar el ADN, ARN u oligonucleótidos y crear así una sonda con la que poder hibridar y posteriormente detectar luminiscentemente.
Las sondas hibridadas se inmunodetectan con anti-digoxigenina, fragmentos Fab (*Fragment antigen-binding*) conjugados con fosfatasa alcalina. Posteriormente se añade un sustrato quimioluminiscente, en este caso CSPD (*chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase*). La desfosforilación enzimática de este sustrato por la fosfatasa alcalina produce una emisión de luz a una longitud de onda de 477 nm que nos permite visualizar aquellos fragmentos hibridados. La señal quimioluminiscente persiste durante días en las membranas de nylon.

El protocolo de esta técnica se encuentra descrito en el Anexo II Protocolo 6.

En el presente estudio se utilizaron sondas correspondientes a (Anexo II, Protocolo 2.6):

- Replicones F para identificar plásmidos multireplicón (hibridación de las membranas resultantes de los S1-PFGE)
- Genes BLEE, AmpC y carbapenemasas para determinar:

- Su localización plasmídica utilizando también sondas correspondientes a los distintos replicones presentes en cada cepa (hibridación de las membranas resultantes de los S1-PFGE).
- Su localización cromosómica utilizando también sondas correspondientes al 16S rRNA (hibridación de las membranas resultantes de los ICeul-PFGE).

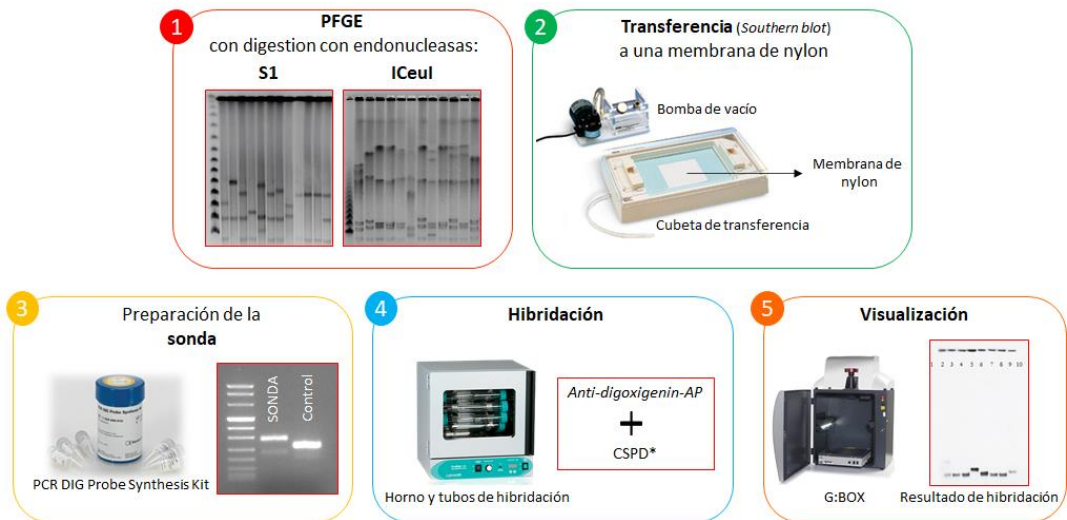


Figura 35. Esquema simplificado de todo el proceso de ICeul/S1-PFGE, *Southern blot* e hibridación.

* Sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina

4.7. Análisis de la distribución de ST de IncI1 e IncN y fórmulas FAB

GrapeTree es una herramienta *online* utilizada para la generación de árboles. GrapeTree facilita el análisis de grandes cantidades de perfiles alélicos mediante el algoritmo *Minimum spanning tree*, reconstruyendo de forma gráfica relaciones genéticas¹⁶¹.

En el presente estudio, esta herramienta fue utilizada para la generación de árboles con los ST obtenidos de los plásmidos IncI1 e IncN. Para ello, los datos obtenidos tanto de los plásmidos IncI1 y IncN como de los IncF (árboles no generados para

IncF), fueron enviados para que se introdujeran en la base de datos del pMLST. Estos árboles se forman de manera automática, con el aplicativo presente en la página web del pMLST (<https://pubmlst.org/plasmid/>), después de seleccionar los parámetros de interés. En este caso, los parámetros seleccionados fueron: Microorganismo *E. coli*, fuente humana, y los esquemas para los plásmidos IncI1 o IncN. Lo mismo para *K. pneumoniae*. Todos los plásmidos con estas características se introdujeron en el aplicativo y, además, se seleccionaron otras variables como genes de resistencia a betalactámicos y país de origen. Una vez generado el árbol, esta herramienta permite, de forma interactiva, seleccionar los parámetros que se desean mostrar en el árbol y cambiar colores si se desea. Se realizaron dos árboles para cada microorganismo y tipo de plásmido, uno mostrando el país de origen donde se han detectado los ST de la base de datos y un segundo mostrando los genes de resistencia a betalactámicos asociados a cada ST.

Dado que los plásmidos IncF pueden ser multireplicón y no se definen por ST si no por fórmulas FAB, con nuestros datos y los de la base de datos, seleccionando los mismos parámetros que para los árboles, se generaron gráficos de barras.

4.8. Análisis estadístico

Los resultados de sensibilidad a los antimicrobianos, grupos filogenéticos, FV y contenido de plásmidos se compararon utilizando Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Todas las comparaciones se realizaron con el programa SPSS (IBM) v24.0. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Cuando se compararon parámetros con multivariantes entre ellos (no entre poblaciones), como los FV, grupos filogenéticos y replicones, además, se aplicó la corrección de Bonferroni. Se trata de un ajuste del nivel de significación en relación con el número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos. Este se calcula dividiendo aquellos valores significativos entre el número de variables, obteniendo así un valor p más restringente y conservador.

5. Resultados

A decorative graphic consisting of a solid green line that loops around the text, a dashed green line that also loops around the text, and a circular DNA double helix structure positioned behind the letter 'o' in the word 'Resultados'.

5.1. Cepas del estudio

Se ha estudiado un total de 359 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, aisladas a partir de muestras fecales de individuos sanos y hemocultivos de los distintos hospitales participantes.

a) Muestras fecales de individuos sanos

De un total de 150 muestras fecales, se aislaron 145 cepas de *E. coli* y 12 de *K. pneumoniae*. En 17 muestras se aislaron dos cepas: a) por presentar tanto *E. coli* como *K. pneumoniae*, o b) porque en una misma muestra se aislaron dos cepas de la misma especie con distinto antibiograma. El número de cepas aisladas se detalla por especie y medio de cultivo utilizado en la Tabla 8.

Tabla 8. Cepas aisladas en cada medio de cultivo utilizado

	CromID ESBL	CCDA	McConkey	Total
<i>E. coli</i>	9	2	134	145
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	12	12

CCDA, del inglés *charcoal cefoperazone deoxycholate agar*

b) Hemocultivos

Se estudiaron un total de 99 cepas de *E. coli* y 103 de *K. pneumoniae* de pacientes con bacteriemia, recolectadas de los distintos hospitales participantes. El número de cepas procedentes de cada hospital se lista en la Tabla 9.

Tabla 9. Procedencia de las cepas de estudio de origen clínico

	HSP	HVH	HC	Total
<i>E. coli</i>	58	34	7	99
<i>K. pneumoniae</i>	46	41	16	103

HSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; HVH, Hospital de la Vall d'Hebrón; HC, Hospital Clínic

5.2. Sensibilidad antimicrobiana y caracterización de genes *bla*

Teniendo en cuenta que los plásmidos juegan un papel crucial en el movimiento y diseminación de las betalactamasas, mecanismo principal de resistencia a betalactámicos en *Enterobacteriaceae*, este trabajo se ha centrado en la detección y caracterización de estas enzimas, las cuales son movilizadas principalmente por plásmidos. Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad frente a otras familias de antimicrobianos.

5.2.1. Estudio de sensibilidad antimicrobiana mediante disco difusión

Del total de cepas de *E. coli* estudiadas en ambas poblaciones (n=244) el 67,2% (164/244) presentó resistencia a alguno de los antimicrobianos evaluados. En *K. pneumoniae*, sin tener en cuenta su resistencia natural a la ampicilina, el 37,4% (43/115) de las cepas fueron resistentes a alguno de los antimicrobianos evaluados; un 20% menos que en *E. coli* a pesar de que el 89,6% de cepas de *K. pneumoniae* (frente aun 40,7% de cepas de *E. coli*) procedían de muestra clínica.

En general, el perfil de resistencia fue mayor en cepas clínicas de ambas especies, con un 63,4% (128/202) de cepas resistentes a algún agente y un 29,2% (59/202) de cepas MDR. En comparación, en las cepas de individuos sanos, se observó un 49,7% (78/157) de cepas resistentes a algún agente y un 10,8% (17/157) de cepas MDR.

En la Tabla 10, se muestran las diferencias significativas que hubo entre la población de cepas de *E. coli* de individuos sanos y la de cepas clínicas con nueve de los antimicrobianos evaluados. Solo se resaltan en *E. coli* dado que la población de *K. pneumoniae* fecal fue muy baja.

a) Perfil de sensibilidad de las cepas de muestras fecales

En *E. coli* (n=145), los mayores porcentajes de resistencia se observaron frente a la ampicilina (40,0%; n=58), ácido nalidíxico (25,5%; n=37), cotrimoxazol (19,3%; n=28) y piperacilina (18,6%; n=27); mientras que todas las cepas resultaron sensibles a carbapenémicos (Tabla 10). Además, el 10,3% (15/145)

de las cepas presentaron perfiles de MDR, y se observaron perfiles fenotípicos de producción de BLEE y/o AmpC en el 9% (13/145) del total de cepas (Fig. 36, Tabla 11).

En *K. pneumoniae* (n=12), aparte de la ampicilina, los mayores porcentajes de resistencia fueron frente a cefalotina (33,3%; n=4) y amoxicilina-ácido clavulánico (25%; n=3), y todas ellas resultaron sensibles a cefuroxima, oxymino-cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos, aminoglucósidos, quinolonas y sulfamidas (Tabla 10). A pesar de observar dos cepas con perfil MDR, ninguno de ellos coincidió con el de producción de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas (Fig. 36, Tabla 11).

b) Perfil de sensibilidad de las cepas de hemocultivo

Los mayores porcentajes de resistencia en las cepas de *E. coli* de procedencia clínica fueron frente a ampicilina (88%; n=87), piperacilina (62,6%; n=62), ácido nalidíxico (53,5%; n=53), cefalotina (45,5%; n=45), ciprofloxacina (44,4%; n=44) y cotrimoxazol (43,4%; n=43); y todas ellas fueron sensibles a carbapenémicos (Tabla 10). Se detectaron perfiles de multiresistencia en el 38,4% (38/99) de las cepas y se observaron perfiles fenotípicos de producción de BLEE y/o AmpC en el 31,3% (31/99) de ellas (Fig. 36, Tabla 11).

En *K. pneumoniae*, se detectó mayor número de cepas resistentes frente al ácido nalidíxico (27,2%; n=28), piperacilina (22,3%; n=23), cefuroxima (20,4%; n=21) y cefalotina (19,4%; n=20) (Tabla 10). Hubo un 19,4% (22/103) de cepas multirresistentes y todas ellas con perfiles fenotípicos compatibles con la producción de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas (Fig. 36, Tabla 11).

Como se muestra en la Tabla 11, los porcentajes más altos de cepas resistentes a uno o más agentes de las familias de antimicrobianos evaluados se encuentran en los betalactámicos, con un 48,7% del total de cepas del estudio. En segundo lugar, tenemos las cepas resistentes a quinolonas (33,1%) y luego a aminoglucósidos (13,1%). Además, entre las cepas de *E. coli* de muestra fecal y clínica se observaron diferencias significativas respecto a los porcentajes de resistencias a agentes

betalectamicos, quinolonas, cotrimoxazol y también entre las cepas MDR o con genes *bla* de ambas poblaciones; observando porcentajes mayores en la población clínica.

Tabla 10. Porcentajes de resistencia, a distintos agentes antimicrobianos, en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas de muestras fecales y hemocultivos

Antimicrobiano	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	Muestra fecal	Hemocultivo	Muestra fecal	Hemocultivo
	n=145 (%)	n=99 (%)	n=12 (%)	n=103 (%)
Ampicilina*	58 (40,0)	87 (88,0)	11 (91,7) ^a	102 (99,0) ^a
Co-amoxiclav	9 (6,2)	12 (12,1)	3 (25,0)	7 (6,8)
Piperacilina*	27 (18,6)	62 (62,6)	1 (8,3)	23 (22,3)
Cefalotina*	13 (9,0)	45 (45,5)	4 (33,3)	20 (19,4)
Cefuroxima*	12 (8,3)	20 (20,2)	0	21 (20,4)
Cefoxitina	5 (3,4)	8 (8,1)	2 (16,7)	12 (11,6)
Cefotaxima*	13 (9,0)	20 (20,2)	0	16 (15,5)
Ceftazidima*	9 (6,2)	15 (15,2)	0	15 (14,6)
Cefepima*	3 (2,1)	7 (7,0)	0	9 (8,7)
Aztreonam*	5 (3,4)	13 (13,1)	0	13 (12,6)
Imipenem	0	0	0	2 (1,9)
Ertapenem	0	0	0	4 (3,9)
Gentamicina	12 (8,3)	12 (12,1)	0	6 (5,8)
Tobramicina*	11 (7,6)	18 (18,1)	0	15 (14,5)
Amikacina	0	1 (1,0)	0	5 (4,8)
Cotrimoxazol*	28 (19,3)	43 (43,4)	0	16 (15,5)
Ácido nalidixico*	37 (25,5)	53 (53,5)	0	28 (27,2)
Ciprofloxacina*	17 (11,7)	44 (44,4)	0	19 (18,4)

^a Las cepas restantes eran fenotípicamente sensibles

* Diferencias significativas entre *E. coli* fecales y clínicas ($p < 0.05$); mayores porcentajes en la población clínica.

		S	≥17	≥18	≥21	≥18	≥18	≥18	≥26	≥21	≥18	≥21	≥23	≥22	≥15	≥15	≥17	≥16	≥19	≥21		
		I	14-16	14-17	18-20	15-17	15-17	15-17	23-25	18-20	15-17	18-20	20-22	19-21	13-14	13-14	15-16	11-15	14-18	16-20		
		R	≤13	≤13	≤17	≤14	≤14	≤14	≤22	≤17	≤14	≤17	≤19	≤18	≤12	≤14	≤14	≤10	≤13	≤15		
Cepa	Especie	AMP	AMC	PIP	CEP	CXM	FOX	CTX	CAZ	CPM	ATM	IMP	ETP	GEN	TOB	AMK	SXT	NAL	CIP	β-lac		
Muestrafecal	SP12	<i>E. coli</i>																			CTX-M-15	
	SP13	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15
	SPk06	<i>K. pneumoniae</i>																				
	SP44	<i>E. coli</i>																				CTX-M-27
	UB2	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	UB7	<i>E. coli</i>																				
	UBK01	<i>K. pneumoniae</i>																				
	UB37	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	HC12	<i>E. coli</i>																				CTX-M-14/15
	HC20	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15
	HC27	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	HC33	<i>E. coli</i>																				
	VH2	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	VH3	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	VH7	<i>E. coli</i>																				CTX-M-14
	VH10	<i>E. coli</i>																				CTX-M-14
	VH17	<i>E. coli</i>																				SHV-12
Hemocultivo	HSP003.H	<i>E. coli</i>																			CTX-M-15	
	HSP004.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP006.H	<i>E. coli</i>																			CTX-M-27	
	HSP013.H	<i>E. coli</i>																			CTX-M-15	
	HSP014.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP018.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP021.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP026.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-14
	HSP031.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15
	HSP034.H	<i>E. coli</i>																				SHV-12
	HSP040.H	<i>K. pneumoniae</i>																				
	HSP041.H	<i>K. pneumoniae</i>																				
	HSP044.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP046.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP048.H	<i>E. coli</i>																				SHV-12/CMY-2
	HSP050.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP051.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15
	HSP052.H	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	HSP056.H	<i>E. coli</i>																				CMY-2
	HSP057.H	<i>K. pneumoniae</i>																				KPC-3
	HSP059.H	<i>E. coli</i>																				
	HSP061.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-14
	HSP065.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15/32
	HSP066.H	<i>K. pneumoniae</i>																				DHA-1
	HSP067.H	<i>E. coli</i>																				CTXM-27/DHA-1
	HSP070.H	<i>K. pneumoniae</i>																				SHV-28
	HSP074.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15
	HSP084.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-14/15
	HSP086.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15
	HSP089.H	<i>K. pneumoniae</i>																				SHV-2
	HSP093.H	<i>K. pneumoniae</i>																				
	HSP095.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-14
	HSP096.H	<i>K. pneumoniae</i>																				KPC-3
	HSP098.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15
HSP104.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CMY-2	
HC01.H	<i>E. coli</i>																					
HC02.H	<i>E. coli</i>																					
HC05.H	<i>E. coli</i>																					
HC08.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15/SHV-28	
HC11.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15	
HC19.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15/SHV-28	
HVH01.H	<i>E. coli</i>																					
HVH02.H	<i>E. coli</i>																					
HVH03.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15	
HVH07.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15	
HVH08.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15	
HVH11.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15	
HVH12.H	<i>E. coli</i>																					
HVH13.H	<i>E. coli</i>																				CTX-M-15	
HVH14.H	<i>E. coli</i>																					
HVH19.H	<i>E. coli</i>																					
HVH26.H	<i>E. coli</i>																					
HVH29.H	<i>E. coli</i>																					
HVH30.H	<i>E. coli</i>																					
HVH31.H	<i>E. coli</i>																					
HVH40.H	<i>K. pneumoniae</i>																				SHV-28	
HVH48.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15	
HVH50.H	<i>K. pneumoniae</i>																				CTX-M-15	
HVH60.H	<i>K. pneumoniae</i>																				SHV-28	

Figura 36. Perfil de sensibilidad de las cepas MDR del estudio y genes *bla* identificados. Rojo, resistente; naranja, intermedio; verde, sensible; β-lac, betalactamasa

Tabla 11. Cepas resistentes a uno o más antimicrobianos de cada familia, cepas MDR y cepas productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas

	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		Total n=359 (%)
	Muestra fecal n=145 (%)	Hemocultivo n=99 (%)	Muestra fecal n=12 (%)	Hemocultivo n=103 (%)	
Betalactámicos**	59 (40,7)	88 (88,9)	5 (41,7)	23 (22,3)	175 (48,7)
Aminoglucósidos	14 (9,6)	18 (18,2)	0	15 (14,5)	47 (13,1)
Quinolonas**	37 (25,5)	54 (54,5)	0	28 (27,2)	119 (33,1)
Cotrimoxazol**	28 (19,3)	43 (43,4)	0	16 (15,5)	87 (24,2)
MDR ^a , **	15 (10,3)	38 (38,4)	2 (16,7)	21 (20,4)	76 (21,2)
BLEE/AmpC/Carb*	13 (9)	19 (19,2)	0	17 (16,5)	49 (13,6)

*Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la población de cepas de *E. coli* de muestra fecal y de hemocultivo; ** $p < 0,001$.

^aNo se tiene en cuenta la resistencia intrínseca de *K. pneumoniae* a la ampicilina para la adjudicación del carácter de MDR.

MDR, *multidrug resistance*; Carb, carbapenemasas

5.2.2. Portadores sanos de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas

Después de la búsqueda activa, con medios selectivos (ChromID ESBL y CCDA), de cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas en muestras fecales, se detectaron un total de 11 (7,3%) portadores sanos. Específicamente, las prevalencias fueron de 4,7% (7/150) para portadores de *E. coli* productoras de BLEE y 2,7% (4/150) de AmpC (Tabla 12). No se detectaron portadores sanos de carbapenemasas. En dos de los portadores se detectaron dos cepas de *E. coli*, con distinto antibiograma, productoras de la misma BLEE (muestra fecal SP13EC) y la misma AmpC (muestra fecal VH03EC) (Tabla 12). Ninguno de los portadores presentaba cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, AmpC ni carbapenemasas.

Tabla 12. Genes que codifican BLEE y AmpC detectados en las cepas de *E. coli* de portadores sanos

Muestra fecal	Cepa	Genes <i>bla</i>
SP13EC	SP12	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
	SP13	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
SP51EC	SP44	<i>bla</i> _{CTX-M-27}
UB02EC	UB02	<i>bla</i> _{CMY-2}
UB39EC	UB37	<i>bla</i> _{CMY-2}
HC12EC	HC12	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
		<i>bla</i> _{CTX-M-14}
HC20EC	HC20	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
HC27EC	HC27	<i>bla</i> _{CMY-2}
VH03EC	VH02	<i>bla</i> _{CMY-2}
	VH03	<i>bla</i> _{CMY-2}
VH06EC	VH07	<i>bla</i> _{CTX-M-14}
VH08EC	VH10	<i>bla</i> _{CTX-M-14}
VH15EC	VH17	<i>bla</i> _{SHV-12}

5.2.3. Caracterización de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas

a) Cepas de muestras fecales

Del 9% de las cepas de *E. coli* en las que se observó un perfil fenotípico que sugería la producción de BLEE y/o AmpC, se confirmó, mediante PCR y secuenciación, que un 5,5% (8/145) de las cepas eran productoras de BLEE tipo SHV o CTX-M y un 3,5% (5/145) de AmpC tipo CMY (Tabla 13). Una de estas cepas (HC12, Tabla 12), resultó ser portadora de los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14} simultáneamente.

b) Cepas de hemocultivos

En las cepas de *E. coli* clínicas, el 17,2% (17/99) eran productoras de BLEE tipo SHV o CTX-M y el 5% (5/99) productoras de AmpC de tipo CMY o DHA (Tabla 13). La cepa HSP065.H era portadora de dos genes *bla*_{BLEE} (*bla*_{CTX-M-15} / *bla*_{CTX-M-32}) y otras dos cepas, la HSP067.H y la HSP048.H portadoras tanto de genes *bla*_{BLEE} como *bla*_{AmpC} (una *bla*_{CTX-M-27}/*bla*_{DHA-1}, y *bla*_{SHV-12}/*bla*_{CMY-2}, respectivamente) (Tabla 13, Fig. 36). En *K. pneumoniae* se detectó un 16,5% (17/103) de cepas productoras de BLEE de tipo SHV o CTX-M, un 1% (1/103) de AmpC de tipo DHA, y un 1,9% (2/103) de carbapenemasas de tipo KPC (Tabla 13). Tres de estas cepas codificaban para dos genes *bla*_{BLEE} (la HSP086.H *bla*_{CTX-M-15} / *bla*_{CTX-M-14}, y las cepas HC08.H y HC19.H *bla*_{CTX-M-15} / *bla*_{SHV-28}) (Tabla 13, Fig. 36).

Tabla 13. Genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas detectados en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivos

	<i>E. coli</i> (n=244)		<i>K. pneumoniae</i> (n=115)	
	Muestra fecal (n=13/145) ^a	Hemocultivo (n=19/99) ^b	Muestra fecal (n=0/12)	Hemocultivo (n=17/103) ^c
	n=8, 5.5%	n=17, 17.2%		n=17, 16.5%
BLEE* (n=43)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=4) <i>bla</i> _{CTX-M-14} (n=3) <i>bla</i> _{CTX-M-27} (n=1) <i>bla</i> _{SHV-12} (n=1)	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=10) <i>bla</i> _{CTX-M-14} (n=2) <i>bla</i> _{CTX-M-27} (n=2) <i>bla</i> _{CTX-M-32} (n=1) <i>bla</i> _{SHV-12} (n=2)	ND	<i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=9) <i>bla</i> _{CTX-M-14} (n=2) <i>bla</i> _{SHV-28} (n=5) <i>bla</i> _{SHV-2} (n=1)
AmpC (n=11)	n=5, 3.5% <i>bla</i> _{CMY-2} (n=5)	n=5, 5.0% <i>bla</i> _{CMY-2} (n=4) <i>bla</i> _{DHA-1} (n=1)	ND	n=1, 1.0% <i>bla</i> _{DHA-1} (n=1)
Carbapenemasas (n=2)	ND	ND	ND	n=2, 1.9% <i>bla</i> _{KPC-3} (n=2)

^a Una cepa de *E. coli* tenía *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14}. ^b Tres cepas de *E. coli* tenían *bla*_{CTX-M-15} / *bla*_{CTX-M-32}, *bla*_{CTX-M-27} / *bla*_{DHA-1} y *bla*_{SHV-12} / *bla*_{CMY-2}. ^c Una cepa de *K. pneumoniae* tenía *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14}, y dos cepas *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{SHV-28}

*Diferencias significativas entre la población de *E. coli* clínica y la de individuos sanos respecto a la presencia de BLEE ($p < 0,05$). ND, no detectado

c) Comparación entre poblaciones y entre especies

Entre la población de cepas de *E. coli* de muestra fecal y la de hemocultivo se observaron diferencias significativas respecto a la presencia de *bla*_{BLEE} con un valor de $p=0,003$, con un porcentaje de cepas portadoras tres veces mayor en hemocultivo que en muestra fecal (Tabla 13). En cambio, respecto a la presencia de *bla*_{AmpC}, no hubo diferencias significativas entre poblaciones ($p=0,5$).

Respecto a las dos especies en estudio, sin diferenciar entre la población clínica y la sana, se observó que la BLEE predominante en ambas fue la CTX-M con un 88,5% en *E. coli* y un 64,7% en *K. pneumoniae*; y el porcentaje restante correspondió en ambas especies a BLEE de tipo SHV. Por otro lado, las AmpC fueron mayoritarias en las cepas de *E. coli* y el 90% de ellas fueron del tipo CMY-2. En la Figura 37 se muestran todos los genes que codifican para BLEE, AmpC y carbapenemasas detectadas y su proporción en ambas especies en estudio.

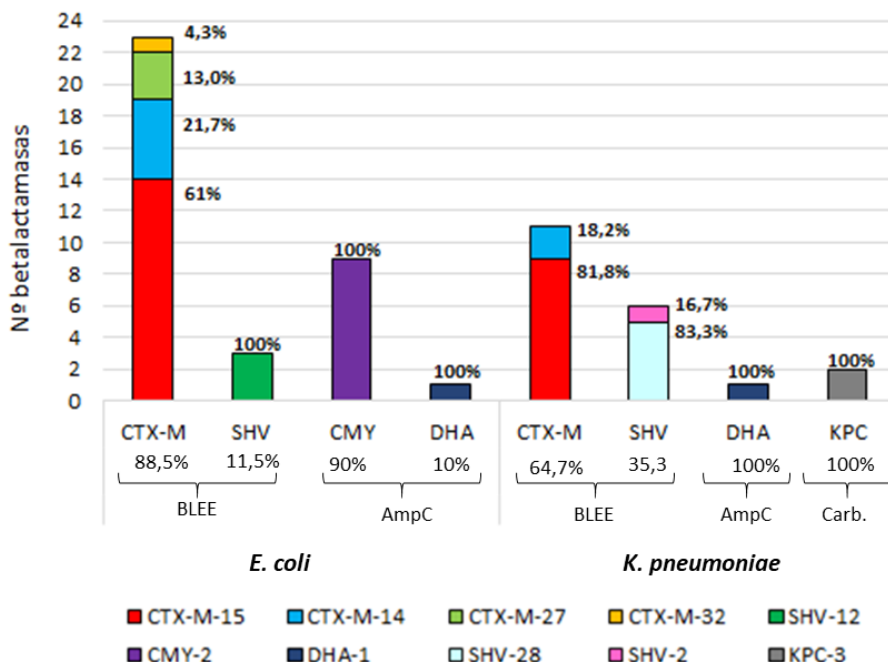


Figura 37. Genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas detectados en *E. coli* y *K. pneumoniae* de ambas poblaciones en estudio.

5.3. Identificación de plásmidos mediante PCR-based replicon typing

En las 359 cepas del estudio, se identificaron un total de 975 replicones. El 65,7% (236/359) de las cepas contenían de uno a tres replicones, siendo tres el número con mayor número de cepas, y el 29,2% (105/359) contenían de cuatro a siete replicones. En el 5% (18/359) restante, no se detectó ninguno de los replicones estudiados.

La dinámica de número de replicones por cepa en *E. coli* de muestra fecal y clínica sigue tendencias distintas. El porcentaje de cepas fecales con un replicón (13,8%, n=20) es significativamente superior que en cepas clínicas (4%, n=4), permanecen prácticamente iguales con 2, 3 y 4 replicones y, la proporción se invierte cuando el número de replicones por cepa es mayor; el porcentaje de cepas con 5 y 6 replicones es superior en las clínicas que en las fecales (15,1%; n=15 vs. 7,6%; n=7 y 7,1%; n=7 vs. 2,1%; n=3), aunque no de forma significativa (Fig. 38).

En el caso de *K. pneumoniae*, los mayores porcentajes se encuentran en el grupo de cepas con uno (32,2%, n=37) o dos (39,1%, n=45) replicones, y el máximo número de replicones por cepa fue de 4 (Fig. 38). Las diferencias entre la población clínica y fecal no se pudieron precisar debido al bajo número de cepas de *K. pneumoniae* de muestras fecales.

Comparando ambas especies microbianas, observamos que, en general, *K. pneumoniae* presenta un contenido de replicones inferior, con una media de 1,8 replicones por cepa, que al de *E. coli*, con una media de 3,1 replicones por cepa.

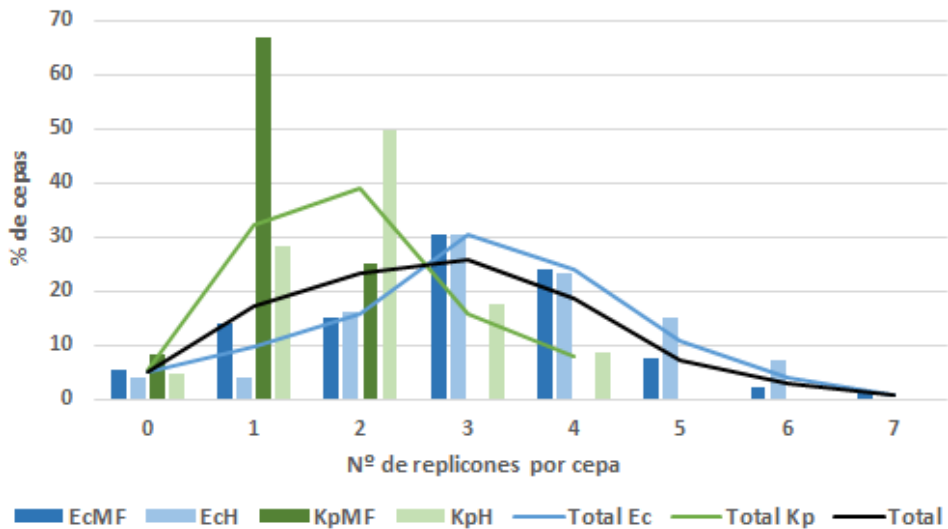


Figura 38. Número de replicones por cepa según el microorganismo y el tipo de muestra.

EcMF, *E. coli* de muestra fecal; EcH, *E. coli* de hemocultivo; KpMF, *K. pneumoniae* de muestra fecal; KpH, *K. pneumoniae* de hemocultivo.

De los 29 replicones estudiados, 24 fueron identificados en alguna de las 359 cepas en estudio. Los replicones FIIS, W, T, U y HI2 no se detectaron en ninguna de las cepas, ni de *E. coli* ni de *pneumoniae*.

En las cepas de *E. coli*, los replicones detectados con más frecuencia en ambas poblaciones fueron (% en heces/ % en hemocultivos): CoIE (60,7%/79,8%), FII (70,3%/76,8%), FIB (63,4%/67,7%), FIA (14,5%/27,3%), I1 (17,2%/22,2%), X1 (20%/18,2%), K (7,6%/13,1%), P (5,5%/10,1%), B/O (9%/5,1%) y X4 (6,2%/5,1%) (Fig. 39A). A pesar de las similitudes entre poblaciones, las frecuencias de estos plásmidos fueron mayores en cepas clínicas, a excepción de los replicones X1, B/O y X4, ligeramente superiores en cepas de muestra fecal. Además, con los replicones CoIE, FIA y P se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones, siendo los porcentajes más altos en las cepas clínicas: 79,8% CoIE, 27,3% FIA, 10,1% P en clínicas vs. 60,7% CoIE, 14,5% FIA, 5,5% P en fecales (Fig. 39A). También se destaca que los replicones A/C, M y N solo se encontraron presentes en cepas de hemocultivo y los replicones FIIK y HI1 solo se observaron en cepas de muestra fecal (Fig. 39A).

En *K. pneumoniae*, los replicones detectados con mayor frecuencia fueron aquellos presentes en ambas poblaciones (% en heces/ % en hemocultivos): ColE (50%/85,4%), FIIK (41,7%/54,4%), R (8,3%/18,4%) e I1 (8,3%/8,7%), además de X3 (8,3%/1,9%) que, aunque no fue de los más frecuentes, también estuvo presente en ambas poblaciones. Por otro lado, los replicones FII (6,8%), L (1%), M (3,9%), N (2,9%), A/C (1,9%), FIB-M (2,9%), HIB-M (2,9%), X4 (2,9%), FIB (1%), K (1%), Y (1%) y X2 (1%), solo se identificaron en cepas de hemocultivo y en bajos porcentajes (Fig. 39B). Cabe destacar que el bajo número de cepas recopiladas de muestra fecal, es una limitación en el momento de establecer diferencias significativas entre las dos poblaciones.

Comparando los replicones detectados en ambos microorganismos indistintamente de la muestra de aislamiento, se observó que, en general, tanto la diversidad como la frecuencia de replicones es mayor en las cepas de *E. coli* que en las de *K. pneumoniae*. Además, esta diferencia de frecuencias se muestra de forma significativa en la mayoría de los replicones presentes en ambos microorganismos (Fig. 39C). Por otro lado, los replicones R y FIIK (específico de *Klebsiella*), son más frecuentes, en las cepas de *K. pneumoniae* (16,5% R y 53% FIIK) que de *E. coli* (2% R y 0,4% FIIK).

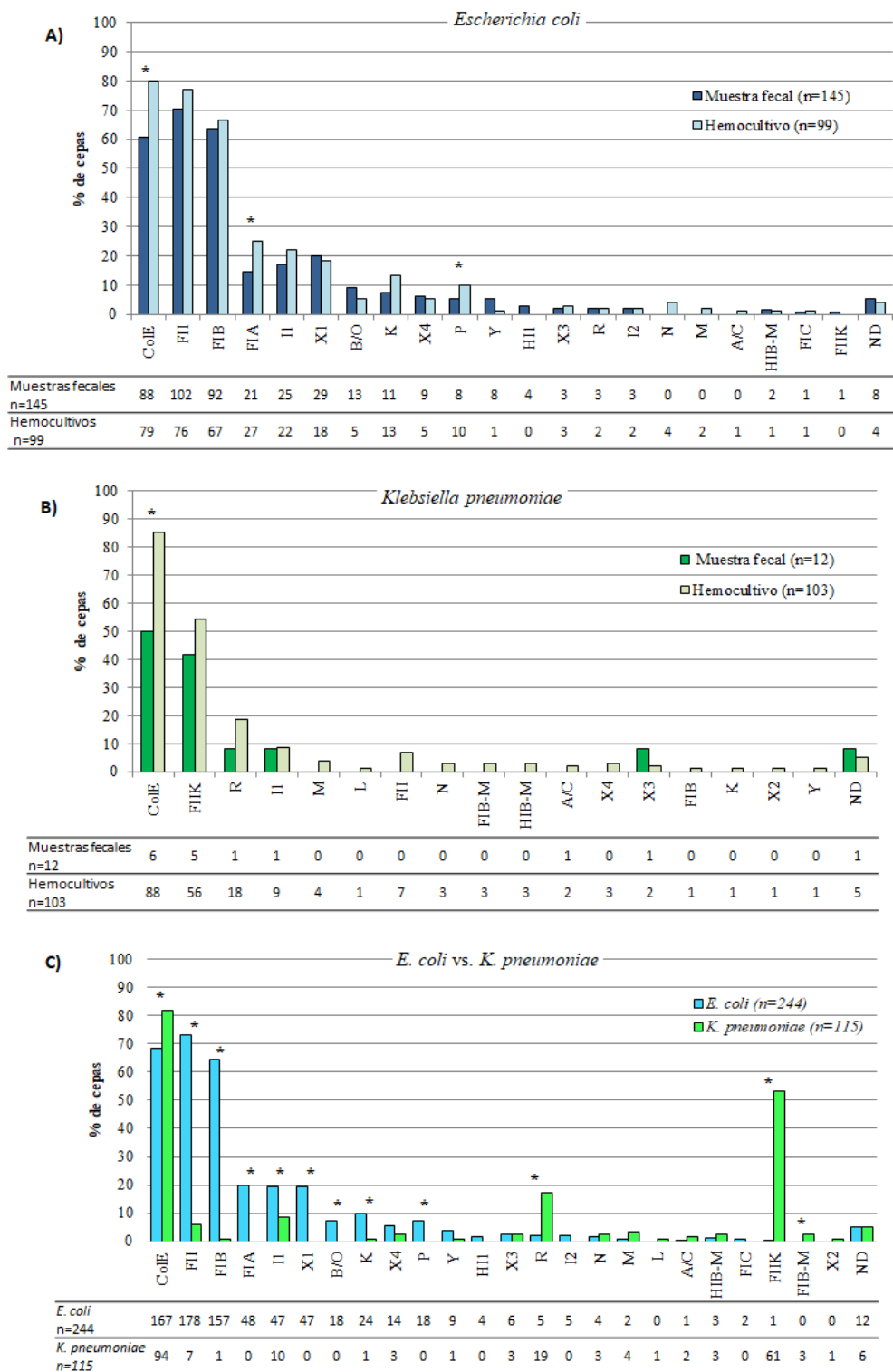


Figura 39. Prevalencia de replicones: A) Comparación entre replicones detectados en *E. coli* de muestras fecales y hemocultivos. B) Comparación entre replicones detectados en *K. pneumoniae* de

muestras fecales y hemocultivos. C) Comparación entre replicones detectados en *E. coli* y *K. pneumoniae* del total de las cepas. Las tablas a pie de cada gráfico muestran el número detectado de cada replicón.

ND, no detectado.

* Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las poblaciones, cepas de muestras fecales y hemocultivos o entre especies, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

5.4. Subtipificación de plásmidos de interés clínico

Teniendo en cuenta la frecuencia y el impacto en la difusión de resistencias a antimicrobianos, algunos plásmidos considerados relevantes en *Enterobacteriaceae*, se han subtipificado mediante la metodología de pMLST, como se describió detalladamente en la introducción y posteriormente en materiales y métodos.

Dentro del conjunto de replicones identificados en las cepas de estudio mediante PBRT, se subtipificaron los plásmidos IncN, Inc11 e IncF. Se descartó la subtipificación de los plásmidos A/C y HI1 por el bajo número obtenido (3 y 4 plásmidos respectivamente) y los HI2 por su ausencia en el estudio.

5.4.1. pMLST de plásmidos IncN

Mediante PBRT se identificaron 7 replicones N, cuatro en cepas de *E. coli* y tres en cepas de *K. pneumoniae*, pero todas ellas procedentes de muestra clínica.

El pMLST de estos plásmidos IncN en cepas de *E. coli* determinó tres ST: ST1, ST7 y ST21; este último corresponde a un nuevo ST identificado en el presente estudio que también fue detectado en una cepa de *K. pneumoniae*. En la cepa HSP37.H de *E. coli*, el plásmido IncN no pudo ser subtipificado debido a la ausencia de producto de amplificación en el alelo *korA*. En *K. pneumoniae* se determinaron el ST9, presente en dos cepas, y el ST21 presente también en *E. coli* (Tabla 14).

Tabla 14. Subtipificación de los plásmidos IncN

Microorganismo	Cepa	Alelos			ST
		<i>repN</i>	<i>traJ</i>	<i>korA</i>	
<i>E. coli</i>	HSP34.H	1	1	1	1
<i>E. coli</i>	HSP37.H	Pos	Pos	Neg	ND
<i>E. coli</i>	HSP65.H	2	12	2	21
<i>E. coli</i>	HC06.H	3	4	2	7
<i>K. pneumoniae</i>	HSP05.H	5	6	3	9
<i>K. pneumoniae</i>	HSP64.H	2	12	2	21
<i>K. pneumoniae</i>	HVH22.H	5	6	3	9

Pos, positivo en la amplificación por PCR; Neg, negativo en la amplificación por PCR; ST, secuenciotipo; ND, no determinado

5.4.2. pMLST de los plásmidos IncI1

Mediante PBRT se identificaron 57 plásmidos con replicón I1 del total de cepas del estudio.

En *E. coli* se detectaron 47 plásmidos IncI1, de los cuales sólo el 85% (40/47) fueron tipables mediante pMLST. Estos 40 IncI1 tipados, se clasificaron en 29 ST distintos de los cuales, al 59% (17/29) se les asignó un nuevo ST, en este estudio. El 50% de los ST tipados pertenecían a cepas de muestra fecal y el otro 50% a cepas de hemocultivo. De todos los ST identificados en *E. coli*, solo dos, el ST12 (tres plásmidos) y el ST36 (4 plásmidos), estuvieron presentes en cepas tanto de muestra fecal como de hemocultivo (Fig. 40). Por otro lado, el ST26 se encontró en una cepa de *E. coli* y otra de *K. pneumoniae*, ambas de origen fecal, y el ST238 en dos cepas de *E. coli* fecales y una de *K. pneumoniae* clínica. En la Figura 40 podemos observar una clara diferenciación entre los plásmidos IncI1 detectados en cepas de origen clínico y los detectados en cepas de individuos sanos. En la Tabla 15 se listan los alelos y ST correspondientes de todas las cepas IncI1 positivas, destacando aquellos ST asignados en el presente estudio. En este caso, el motivo por el cual algunos de los

ST no pudieron ser determinados fue porque, o bien no se obtuvo producto de amplificación (n=9) como en el caso de los IncN, o bien se observaron heterodúplex (n=4) en alguna de las secuencias de los alelos.

En *K. pneumoniae*, se detectaron 10 plásmidos IncI1, y solo el 50% pudo ser tipado. Cuatro de ellos, presentes en cepas de hemocultivos, fueron asignados con un nuevo ST (ST238, ST255, ST260, ST261) (Tabla 15). Solo se detectó un único plásmido IncI1 con ST26 entre las 12 cepas fecales. El ST26, de la cepa fecal, y el ST 238 de una cepa clínica, fueron los únicos compartidos con cepas de *E. coli* (Fig. 40).

Tabla 15. Subtipificación de los plásmidos IncI1

	Microorganismo	Cepa	<i>rep1</i>	<i>ardA</i>	<i>trbA</i>	<i>sogS</i>	<i>pill</i>	ST
Muestra fecal	<i>E. coli</i>	SP12	1	31	8	6	12	192
	<i>E. coli</i>	SP45	1	4	3	4	1	12
	<i>E. coli</i>	UB02	1	3	27	6	10	171
	<i>E. coli</i>	UB06	Neg	Neg	Neg	12	Neg	ND
	<i>E. coli</i>	UB15	1	47	2	4	1	253
	<i>E. coli</i>	UB21	1	Neg	Neg	9	1	ND
	<i>E. coli</i>	UB28	1	Neg	Neg	2	1	ND
	<i>E. coli</i>	UB35	1	47	2	9	1	254
	<i>E. coli</i>	UB37	1	2	3	2	1	2
	<i>E. coli</i>	HC01	1	4	9	12	1	262
	<i>E. coli</i>	HC02	1	19	6	3	1	263
	<i>E. coli</i>	HC04	1	4	2	9	3	36
	<i>E. coli</i>	HC07	1	31	8	6	12	192
	<i>E. coli</i>	HC10	1	25	6	3	27	236
	<i>E. coli</i>	HC12	3	25	6	3	3	170
	<i>E. coli</i>	HC13	Neg	25	Neg	Neg	1	ND
	<i>E. coli</i>	HC15	1	25	6	3	3	238
	<i>E. coli</i>	HC16	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	ND
	<i>E. coli</i>	HC23	1	4	2	9	3	36
	<i>E. coli</i>	HC27	4	5	15	9	3	239
	<i>E. coli</i>	VH02	1	2	21	4	1	237
	<i>E. coli</i>	VH03	1	4	3	4	1	12
	<i>E. coli</i>	VH07	1	2	9	6	1	17
	<i>E. coli</i>	VH10	1	25	6	3	3	238
	<i>E. coli</i>	VH24	1	4	13	2	1	26
		<i>K. pneumoniae</i>	HCKP01	1	4	13	2	1

En rojo se muestran los ST asignados en el presente estudio.

Neg, negativo; Pos, positivo pero no secuenciado; Hd, heteroduplex

Tabla 15. Continuación

	Microorganismo	Cepa	<i>rep1</i>	<i>ardA</i>	<i>trbA</i>	<i>sogS</i>	<i>pilL</i>	ST
Hemocultivo	<i>E. coli</i>	HSP014.H	1	2	27	2	10	256
	<i>E. coli</i>	HSP021.H	1	4	5	4	2	80
	<i>E. coli</i>	HSP024.H	1	4	16	9	2	48
	<i>E. coli</i>	HSP025.H	1	4	16	Hd	2	ND
	<i>E. coli</i>	HSP039.H	1	4	17	1	2	257
	<i>E. coli</i>	HSP042.H	1	4	2	9	3	36
	<i>E. coli</i>	HSP043.H	1	4	2	9	3	36
	<i>E. coli</i>	HSP044.H	1	2	2	9	3	213
	<i>E. coli</i>	HSP048.H	1	4	3	4	1	12
	<i>E. coli</i>	HSP051.H	1	4	5	4	2	80
	<i>E. coli</i>	HSP052.H	4	14	15	4	4	258
	<i>E. coli</i>	HSP055.H	2	4	5	10	2	259
	<i>E. coli</i>	HSP056.H	10	15	26	7	3	292
	<i>E. coli</i>	HSP065.H	1	4	5	4	2	80
	<i>E. coli</i>	HSP077.H	1	18	3	4	1	298
	<i>E. coli</i>	HC05.H	1	2	5	1	1	264
	<i>E. coli</i>	HC07.H	1	4	16	9	2	48
	<i>E. coli</i>	HVH07.H	1	46	27	1	2	252
	<i>E. coli</i>	HVH20.H	1	2	38	2	3	250
	<i>E. coli</i>	HVH21.H	1	2	27	1	30	251
	<i>E. coli</i>	HVH23.H	Neg	38	Neg	Neg	2	ND
	<i>E. coli</i>	HVH31.H	1	4	16	9	2	48
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP05.H	1	Neg	5	Pos	1	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP31.H	1	4	2	Hd	1	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP40.H	1	4	Neg	4	1	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP41.H	1	25	Hd	3	Hd	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP57.H	1	25	6	3	3	238
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP64.H	1	4	2	3	4	260
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP71.H	1	4	5	4	4	255
	<i>K. pneumoniae</i>	HSP72.H	1	2	26	12	1	261
	<i>K. pneumoniae</i>	HVH41.H	Neg	14	Hd	Hd	2	ND

En rojo se muestran los ST asignados en el presente estudio.

Neg, negativo; Pos, positivo pero no secuenciado; Hd, heteroduplex

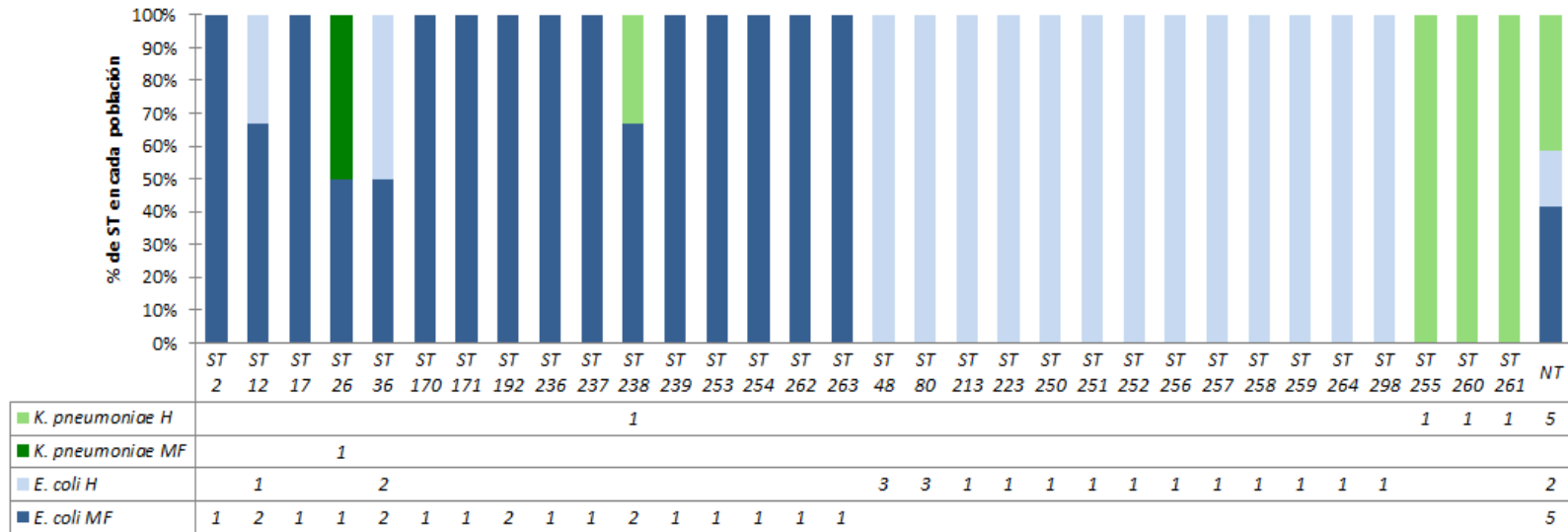


Figura 40. Distribución de los ST de plásmidos Incl1 en *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivos. Cada barra compara la contribución en porcentajes de ST en cada población y la tabla muestra el número final de cada ST detectado en cada población.

NT, no tipificable; H, hemocultivo; MF, muestra fecal; ST, secuencia tipo de plásmidos Incl1

5.4.3. RST de los plásmidos IncF

El análisis mediante RST se llevó a cabo en las 261 cepas positivas para alguno de los replicones F, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*. De estas 261 cepas, el 40% (n=104) presentaban solo uno de los replicones de esta familia, y el 60% (n=157) eran portadoras de más de un replicón F. Como se comenta en la metodología, con el fin de establecer la fórmula FAB de un plásmido IncF, primero hay que determinar si las cepas con más de un replicón son portadoras de más de un plásmido IncF o bien, si el conjunto de replicones forma parte de un plásmido multireplicón. Por lo tanto, la técnica de *Southern blot* se aplicó para el análisis de las 157 cepas con más de un replicón.

De este modo, el *Southern blot* de los geles S1-PFGE y la posterior hibridación de las membranas con las sondas de los distintos replicones F (Fig. 41), nos permitió definir que, de las 157 cepas con más de un replicón, 18 de ellas presentaban dos plásmidos IncF; por lo tanto, se identificaron 175 plásmidos IncF. En total, contando las cepas con un único replicón (n=104), se obtuvieron 279 plásmidos IncF, 211 provenientes de las cepas de *E. coli* y 68 de *K. pneumoniae*.

Adicionalmente, en la fase S1-PFGE se determinaron los tamaños de estos plásmidos y se encontró que, los plásmidos IncF con replicones FII, FIA y/o FIB presentaban tamaños de entre 48 y 200 Kb, en cambio, los plásmidos con replicón FIII, eran algo más grandes, con tamaños de entre 145 y 267 Kb

5.4.3.1. Definición de las fórmulas FAB

Una vez establecido el número de plásmidos IncF, se definió la fórmula FAB de cada uno de ellos mediante el RST.

En *E. coli*, el 97% (205/211) de los plásmidos IncF pudieron ser subtipificados, obteniendo un total de 86 fórmulas FAB diferentes. De estas, el 52,3% (45/86) derivaron de cepas fecales, el 27,9% (24/86) de cepas clínicas y el 19,8% se detectaron en cepas de ambas poblaciones. Estos resultados nos muestran que

existe una mayor diversidad de estos plásmidos en *E. coli* de individuos sanos que en las cepas clínicas. Aun así, como se observa en la Figura 42, este casi 20% de fórmulas FAB compartidas entre ambas poblaciones, forma parte del conjunto de fórmulas más frecuentes. Entre ellas, las más prevalentes fueron, F29:A-:B10, F2:A-:B1, F2:A-:B- y F24:A-:B1 (Fig. 42).

En *K. pneumoniae*, todos los plásmidos IncF fueron subtipificados, organizándose en 16 fórmulas FAB diferentes. Todas ellas fueron identificadas en cepas clínicas, y sólo las fórmulas K4:A-:B-, K6:A-:B-, K7:A-:B- y K17:A-:B fueron también detectadas en cepas fecales (Fig. 42).

La fórmula FAB F2:A-:B-, una de las más prevalentes en cepas de *E. coli*, también fue detectada de forma frecuente en cepas clínicas de *K. pneumoniae*. La fórmula K7:A-:B-, aparte de encontrarse en ambas poblaciones de *K. pneumoniae*, también fue detectada en una de las cepas de *E. coli* fecales (Fig. 42).

En la Tabla 16 se describen aquellos alelos y RST identificados (nueva asignación) en el presente estudio. La lista completa se detalla en el Anexo III.

Tabla 16. Alelos de los plásmidos IncF de nueva asignación.

	Microorganismo	Cepa	Alelos			RST
			FII	FIA	FIB	
Muestra fecal	<i>E. coli</i>	SP12	99		45	F99:A-:B45
	<i>E. coli</i>	SP48	100			F100:A-:B-
	<i>E. coli</i>	UB26	101			F101:A-:B-
	<i>E. coli</i>	SP31	1	1	66	F1:A1:B66
	<i>E. coli</i>	SP42	104		67	F104:A-:B67
	<i>E. coli</i>	HC24	24		68	F24:A-:B68
	<i>E. coli</i>	SP32	102	17		F102:A17:B-
	<i>E. coli</i>	HC25	103		28	F103:A-:B28
Hemocultivo	<i>E. coli</i>	HVH04H	112		16	F112:A-:B16
	<i>E. coli</i>	HSP043H	16		72	F16:A-:B72
	<i>E. coli</i>	HSP076H	24		73	F24:A-:B73
	<i>K. pneumoniae</i>	HVH60H	51		74	F51:A-:B74

En rojo, se resaltan aquellos alelos asignados en el presente estudio.

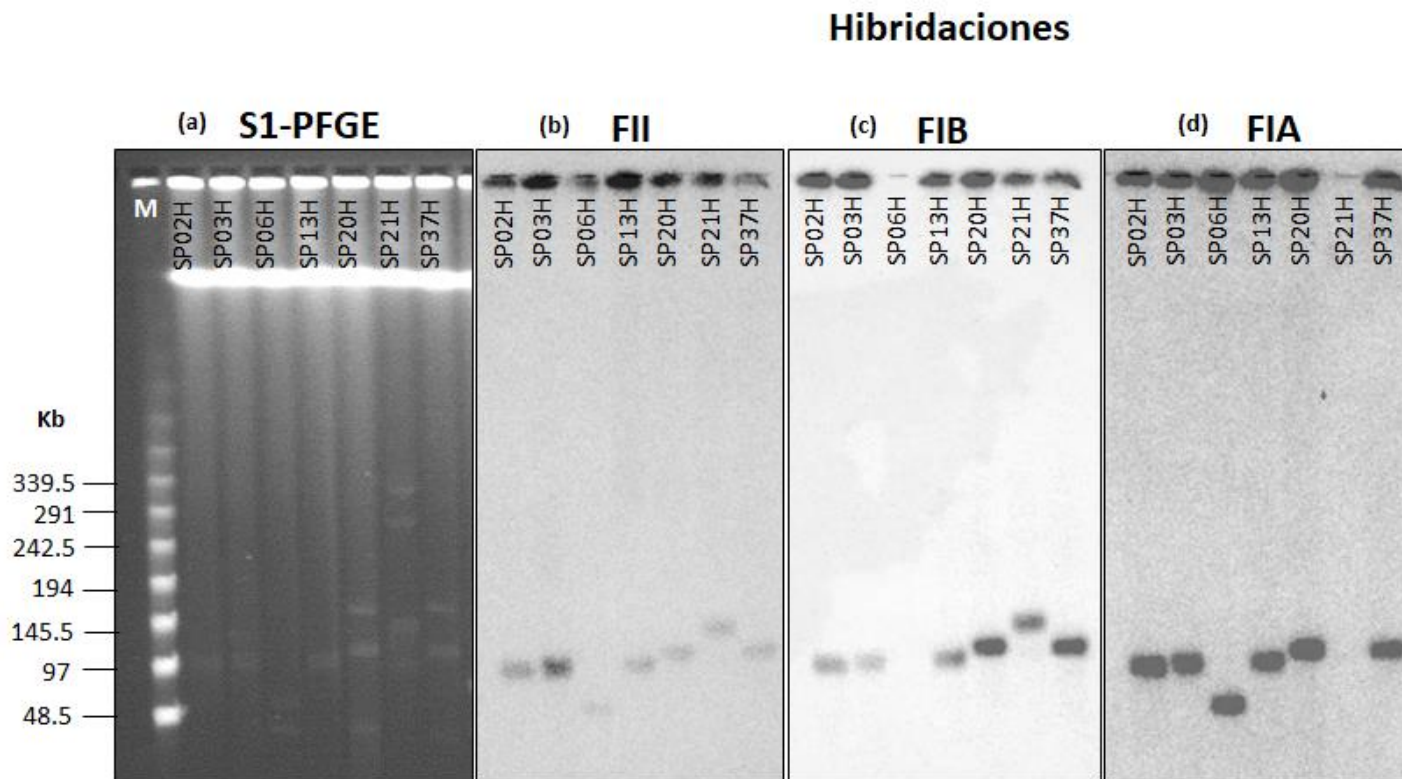


Figura 41. Ejemplo de la localización de los replicones F (FII, FIB, FIA) en un plásmido. S1-PFGE de diferentes cepas **(a)** e hibridación con las sondas correspondientes a los replicones FII **(b)**, FIA **(c)** y FIB **(d)**. La muestra SP06H hibridó con las sondas FII y FIA en la misma posición (≈ 50 Kb), dando como resultado un plásmido con formula FAB, F +: A +: B-; el resto de las cepas de la imagen hibridaron con las tres sondas (F +: A +: B +) dando plásmidos de entre 48,5 y 145,5 Kb. M: Lambda PFG Ladder (New England BioLabs Inc).

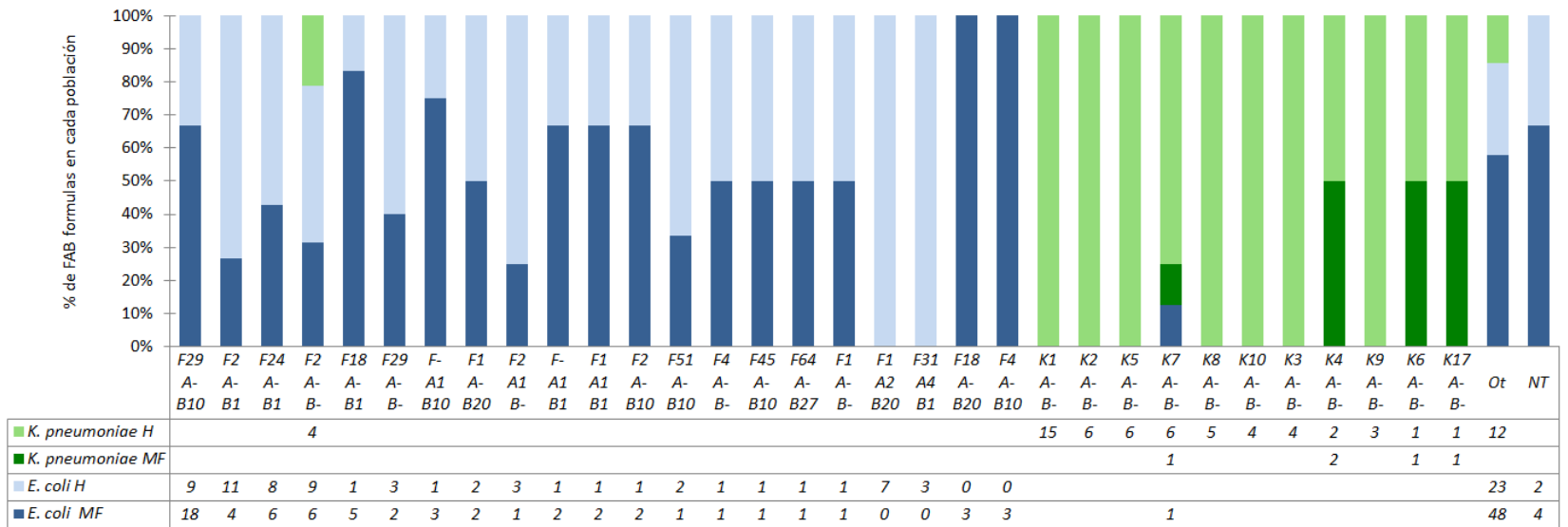


Figura 42. Distribución de fórmulas FAB detectadas con mayor frecuencia en *E. coli* y *K. pneumoniae* de muestras fecales y hemocultivo, y las fórmulas compartidas entre poblaciones. Cada barra compara la contribución en porcentaje de las fórmulas FAB en cada población y la tabla muestra el número final de cada fórmula FAB detectada. NT, no tipificable; Ot, otros; H, hemocultivo; MF, muestra fecal

5.5. Localización plasmídica de los genes de resistencia BLEE, AmpC y carbapenemasas

La técnica de *Southern blot*, también fue utilizada con el fin de determinar la localización de los genes de resistencia detectados. Para ello se realizó el S1-PFGE de las 49 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* identificadas como portadoras de algún gen BLEE, AmpC o carbapenemasa. Posteriormente, se realizó la hibridación con las sondas pertinentes, tanto para los genes de resistencia como para los distintos plásmidos presentes en cada cepa (Fig. 43). El total de genes detectados por PCR fue de 56; 43 genes bla_{BLEE} , 11 genes bla_{AmpC} y 2 genes bla_{carb} (Tabla 13). El 73,2% (41/56) de estos genes fueron localizados en plásmidos.

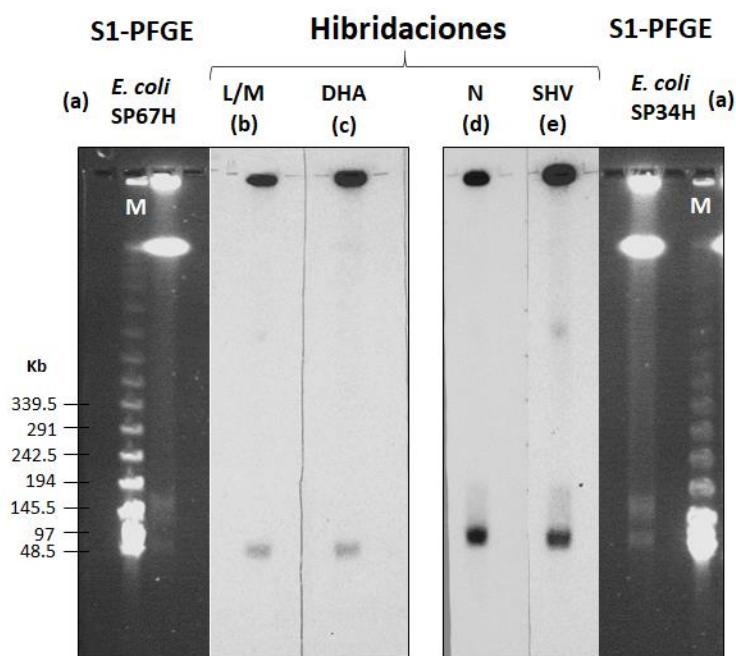


Figura 43. Ejemplo de la localización de genes de resistencia BLEE y AmpC en un plásmido. S1-PFGE de dos cepas de *E. coli* de hemocultivo (a) e hibridación con las sondas correspondientes a los replicones L/M (b) y N (d), y betalactamasas DHA (c) y SHV (e) como genes de resistencia. M, Lambda PFG Ladder (New England BioLabs Inc).

En *E. coli*, de los 36 genes codificantes de BLEE y AmpC identificados, el 72,2% (26/36) se localizaron en plásmidos. De estos 26, el 38,5% (10/26) formaban parte de algún plásmido IncF, otro 38,5% de un IncI1, el 11,1% (3/26) se localizó en plásmidos multireplicón IncF/IncI1 o IncF/IncI1/IncK, y el 11,5 (3/26) restante, en plásmidos IncK, IncN o IncM (Fig. 44).

En *K. pneumoniae*, se identificaron 20 genes codificantes de BLEE, AmpC o carbapenemasas, el 75% (15/20) de los cuales se localizaron en algún plásmido. De estos 15 genes, el 46,7% (7/15) se encontró en plásmidos IncF, el 20% (3/15) en plásmidos IncR, el 13,3% (2/15) en plásmidos multireplicón IncF/IncR y el 20% (3/15) restante, en plásmidos IncK, IncM y uno de los genes *bla*_{KPC} en un plásmido de replicón no identificado (Fig. 44).

En ambas especies, los genes codificantes de BLEE predominantes fueron de tipo *bla*_{CTX-M} y se encontraron asociados, principalmente, a plásmidos IncF (66,7%, 16/24). Más de la mitad de estos *bla*_{CTX-M}, 54,1% (13/24), eran *bla*_{CTX-M-15}, seguidos de *bla*_{CTX-M-14} (29,2%, 7/24), *bla*_{CTX-M-27} (12,5%, 3/24) y *bla*_{CTX-M-32} (4,2%, 1/24). Los otros genes BLEE detectados en plásmidos fueron *bla*_{SHV}, específicamente, *bla*_{SHV-12} en *E. coli* y *bla*_{SHV-2} y *bla*_{SHV-28} en *K. pneumoniae*. Estos genes se localizaron en distintos plásmidos, entre ellos IncF, IncN, IncR y plásmidos multireplicón (Fig. 44).

Respecto a los genes de betalactamasas tipo AmpC identificados, el 80% (8/10) eran *bla*_{CMY-2} y los restantes *bla*_{DHA-1}. El 87,5% (7/8) de los genes *bla*_{CMY-2} se localizaron en plásmidos IncI1. Los genes *bla*_{DHA-1}, se detectaron uno en cada especie bacteriana, pero ambas en plásmidos IncM (Fig. 44).

Por último, los dos genes codificantes de carbapenemasas tipo *bla*_{KPC} detectados en cepas clínicas de *K. pneumoniae* se localizaron, uno en un plásmido IncF y el otro en un pequeño plásmido de unas 49 Kb del que no se pudo identificar el grupo Inc al que pertenecía.

En general, de los 37 plásmidos identificados con algún gen BLEE, AmpC o de carbapenemasa asociado, el 54,1% (20/37) eran plásmidos IncF.

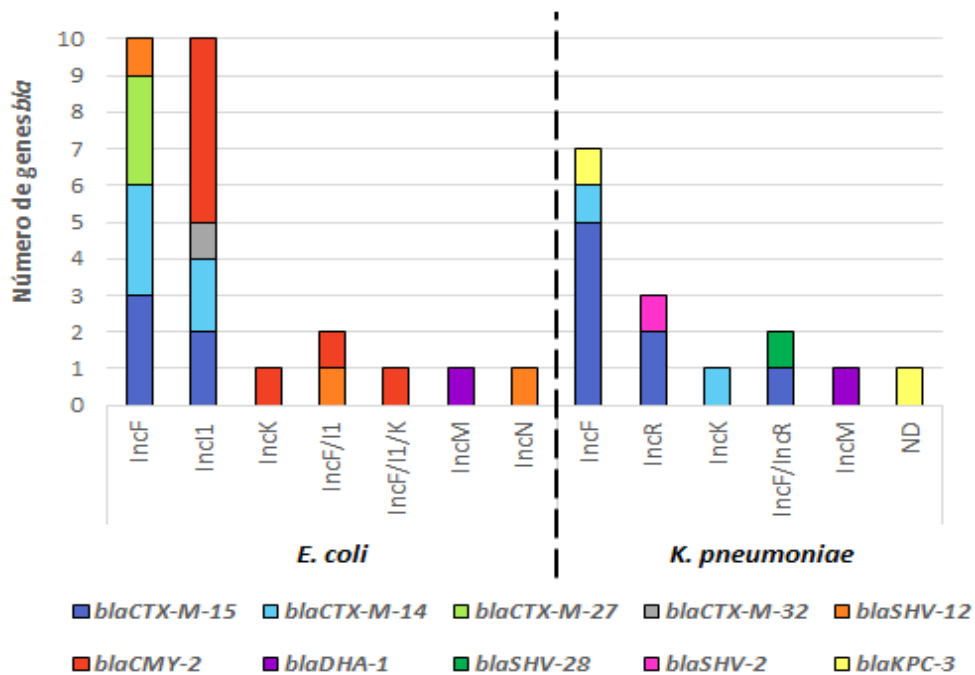


Figura 44. Plásmidos asociados a los genes *bla* detectados en las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Comparando entre la población de plásmidos portadores de betalactamasas de cepas de origen clínico y de individuos sanos, se pudo observar cómo la variedad de grupos Inc/rep, era mayor en las cepas de origen clínico; sobre todo en aquellos plásmidos de *E. coli* portadores de alguna AmpC (Fig. 45). A pesar de que las cepas de *K. pneumoniae* no se pudieron comparar por la ausencia de genes *bla* en las cepas de individuos sanos, las de origen clínico presentaron también mayor variedad de plásmidos portadores de betalactamasas que las cepas de *E. coli* fecales (Fig. 45).

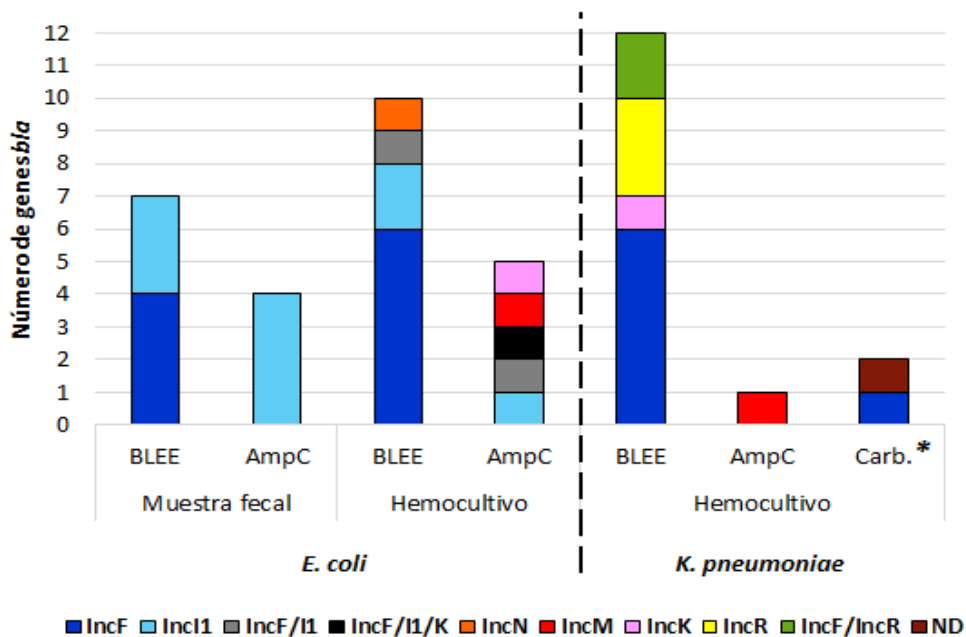


Figura 45. Distribución de los genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas de *E. coli* y *K. pneumoniae* de ambas poblaciones en los distintos grupos Inc.

En la Tabla 17, se muestran todos los genes BLEE, AmpC y carbapenemasas, el plásmido en que se ha localizado y la fórmula FAB o ST correspondiente.

El plásmido F con la fórmula F2:A-:B-, fue de los más frecuentes (n=19), un 15,8% (3/19) de los casos portaba genes BLEE *bla*_{CTX-M} (destacada en negrita en la Tabla 17) y se identificó en *E. coli* de ambas poblaciones y en una cepa clínica de *K. pneumoniae*. El plásmido con fórmula F1:A6:B- fue detectado en dos ocasiones, ambos en cepas de *E. coli* de hemocultivo y asociadas a *bla*_{CTX-M}. El plásmido con fórmula K7:A-:B- se detectó en una cepa de *E. coli* de muestra fecal y en siete cepas de *K. pneumoniae*, una de ellas fecal. De las seis cepas de *K. pneumoniae* de hemocultivo con esta fórmula, el 50% estaban asociadas a genes *bla*_{CTX-M} (Tabla 17).

Con respecto a los plásmidos IncI1, se destaca el ST12, el cual fue identificado en 3 cepas de *E. coli*, dos fecales y una de hemocultivo, y en los tres casos eran portadores del gen *bla*_{CMY-2} (Tabla 17).

Tabla 17. Localización de los genes *bla* detectados en plásmidos

Genes <i>bla</i> detectados	Plásmidos del estudio con genes <i>bla</i>		
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>
	Muestra fecal (n=10)	Hemocultivo (n=12)	Hemocultivo (n=14)
<i>bla</i> _{CTX-M-15} n=13	IncF (F1:A1:B16) IncI1 (ST170)	IncF (F2:A-:B10) IncF (F2:A-:B-) IncI1 (ST80)	IncR IncR IncF (K7:A-:B-) IncF (K7:A-:B-) IncR/IncF (K7:A-B-) IncF (K9:A-:B-) IncF (F2:A-:B-) IncF (K1:A-:B-)
<i>bla</i> _{CTX-M-14} n=7	IncI1 (ST170) IncI1 (ST238) IncF (F35:A-:B-)	IncF (F1:A6:B-) IncF (F-:A6:B1)	IncF (K7:A-:B-) IncK
<i>bla</i> _{CTX-M-27} n=3	IncF (F2:A-:B-)	IncF (F1:A6:B-) IncF (F1:A6:B20)	
<i>bla</i> _{CTX-M-32} n=1		IncI1 (ST80)	
<i>bla</i> _{SHV-12} n=3	IncF (F2:A1:B56)	IncN (ST1) IncF (F18:A-:B1)/ IncI1 (ST12)	
<i>bla</i> _{SHV-28} n=1			IncF (K8:A-:B-)/IncR
<i>bla</i> _{SHV-2} n=1			IncR
<i>bla</i> _{CMY-2} n=8	IncI1 (ST12) IncI1 (ST12) IncI1 (ST237) IncI1 (ST239)	IncF (F18:A-:B1)/IncI1 (ST12) IncF (F-:A-:B29)/IncI1 (ST292)/IncK IncK IncI1 (ST258)	
<i>bla</i> _{DHA-1} n=2		IncM	IncM
<i>bla</i> _{KPC-3} n=2			IncF (K1:A-:B-) ND

Los plásmidos asociados a más de un gen *bla*, se muestran marcados del mismo color.

De los 15 genes *bla* restantes no localizados en ningún plásmido, cuatro eran *bla*_{SHV-28} en *K. pneumoniae*, uno era *bla*_{CMY-2} en *E. coli* y diez eran *bla*_{CTX-M-15} en nueve *E. coli* y una *K. pneumoniae*. Para confirmar su localización cromosómica, se realizó un ICeul-PFGE y una posterior hibridación con sondas para los genes *bla* correspondientes y el 16S rRNA. Con este procedimiento, solo se pudo confirmar la localización cromosómica de cuatro de los genes: dos *bla*_{CTX-M-15} se localizaron en el

cromosoma de las cepas de *E. coli* SP13 y SP03H, otro $bla_{CTX-M-15}$ en el cromosoma de la cepa SP104H de *K. pneumoniae* y el gen bla_{CMY-2} en el cromosoma de la cepa de *E. coli* UB02 (Fig. 46).

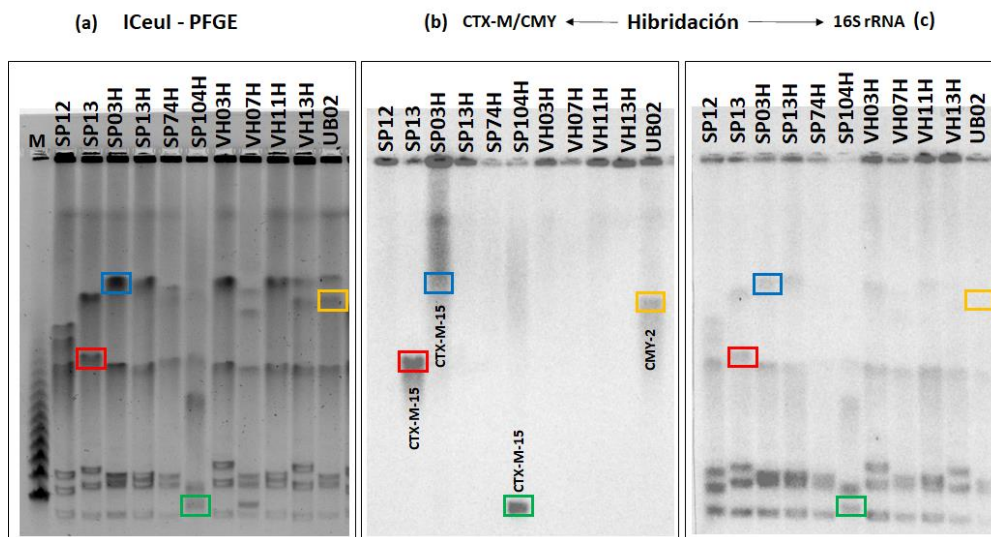


Figura 46. Localización de genes de resistencia $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{CMY-2} en el cromosoma bacteriano. (a) ICEul-PFGE de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (SP104H) con genes *bla* de posible localización cromosómica. (b) Hibridación con las sondas correspondientes a los genes $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{CMY-2} , y al (c) 16S rRNA. Los cuadros a color marcan la posición en el PFGE y la posterior hibridación en la misma posición tanto para el gen *bla* como para el 16S rRNA. Cada color corresponde a una única muestra. M, Lambda PFG Ladder (New England BioLabs Inc).

En la Figura 47, además de ver los plásmidos asociados a alguno de los genes *bla* estudiados, se muestran sus tamaños, el perfil plasmídico de todas las cepas con genes que codifican BLEE, AmpC o carbapenemasas, se hayan o no localizado en plásmidos y, además, el grupo filogenético de las cepas de *E. coli*, del cual se hablará más adelante.

Muestra				BLEE			AmpC CP			PBRT										Localización de los genes <i>bla</i>		Tamaño plásmido (Kb)												
Mo	Fecal Hemoc.	Cepa	Filogrupo	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	<i>bla</i> _{SHV-12}	<i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{SHV-2}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{IPC-3}	ColE	I1	FIA	FIB	FII	B/O	I2	P	FIC		X1	X4	R	K	Y	FIK	N	L/M	FIB-M	Gen <i>bla</i>	Plásmido	
		UB37	B1																												<i>bla</i> _{CMY-2}	Incl1 (ST12)	72	
		VH10	B1																												<i>bla</i> _{CTX-M-14}	Incl1 (ST238)	48,5	
		VH17	B1																												<i>bla</i> _{SHV-12}	F2:A1:B56	72	
		UB2	B2																												<i>bla</i> _{CMY-2}	ND	-	
		HC20	B2																												<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F1:A1:B16	97	
		VH2	B2																												<i>bla</i> _{CMY-2}	Incl1 (ST237)	97	
		VH3	B2																												<i>bla</i> _{CMY-2}	Incl1 (ST12)	97	
		SP44	D																												<i>bla</i> _{CTX-M-27}	F2:A-B	72	
		HC12	D																												<i>bla</i> _{CTX-M-14} / <i>bla</i> _{CTX-M-15} ^a	Incl1 (ST170)	72	
		VH7	D																												<i>bla</i> _{CTX-M-14}	F35:A-B	48,5	
		SP12	E																												<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-	
		SP13	F																												<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-	
		HC27	F																												<i>bla</i> _{CMY-2}	Incl1 (ST239)	48,5	
Escherichia coli		HSP65.H	A																												<i>bla</i> _{CTX-M-15} / <i>bla</i> _{CTX-M-32} ^a	Incl1 (ST80)	145,5	
		HSP03.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HSP06.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-27}	F1:A6:B	48,5
		HSP13.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HSP26.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-14}	F-A6:B1	97
		HSP34.H	B2																													<i>bla</i> _{SHV-12}	InclN (ST1)	97
		HSP56.H	B2																													<i>bla</i> _{CMY-2}	F-A-B29 / Incl1 (ST292) / InclK ^b	145,5
		HSP61.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-14}	F1:A6:B	145,5
		HSP74.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HC01.H	B2																													<i>bla</i> _{CMY-2}	InclK	48,5
		HVH03.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HVH07.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HVH08.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F2:A-B	97
		HVH11.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HVH13.H	B2																													<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-
		HSP48.H	E																													<i>bla</i> _{SHV-12} / <i>bla</i> _{CMY-2} ^a	F18:A-B1 / Incl1 (ST12) ^b	170
		HSP52.H	E																													<i>bla</i> _{CMY-2}	Incl1 (ST258)	48,5
	HSP67.H	E																													<i>bla</i> _{CTX-M-27}	F1:A6:B20	121	
	HSP51.H	F																													<i>bla</i> _{DHA-1}	InclM	48,5	
																															<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F2:A-B10	194	

Figura 47. Heat-map de las 49 cepas (32 *E. coli* y 17 *K. pneumoniae*) portadoras de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas de muestra fecal y hemocultivo. Los cuadros negros y blancos indican la presencia o ausencia, respectivamente, del factor en cuestión. Mo, microorganismo; Hemoc, hemocultivo; CP, carbapenemasa; ND, no determinado; ^a Genes *bla* detectados en el mismo plásmido; ^b Plásmidos donde la hibridación con las sondas de los replicones pertinentes tuvieron lugar en el mismo plásmido (plásmido híbrido).

Figura 47. Continuación

Muestra		BLEE													AmpC CP										PBRT										Localización de los genes <i>bla</i>		Tamaño plásmido (Kb)
Mo	Fecal Hemoc.	Cepa	Filegrupo	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	<i>bla</i> _{CTX-M-32}	<i>bla</i> _{SHV-12}	<i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{SHV-2}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Cole	I1	FIA	FIB	FII	B/O	I2	P	FIC	X1	X4	R	K	Y	FIK	N	L/M	FIB-M	Gen <i>bla</i>	Plásmido				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		HSP31.H		■											■	■																	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncR	48,5		
		HSP57.H													■	■	■																<i>bla</i> _{KPC-3}	Replicón no identificado	48,5		
		HSP66.H													■	■																	<i>bla</i> _{DHA-1}	IncM	48,5		
		HSP70.H								■					■	■																	<i>bla</i> _{SHV-28}	K8:A:-B- / IncR ^b	48,5		
		HSP86.H		■	■										■	■																	<i>bla</i> _{CTX-M-14/bla} _{CTX-M-15} ^a	K7:A:-B-	245		
		HSP89.H		■											■	■											■						<i>bla</i> _{CTX-M-15}	IncR	72		
		HSP93.H									■				■	■									■								<i>bla</i> _{SHV-2}	IncR	97		
		HSP96.H			■										■	■												■					<i>bla</i> _{CTX-M-14}	IncK	194		
		HSP98.H													■	■																	<i>bla</i> _{KPC-3}	K1:A:-B-	267		
		HSP104.H		■											■	■																	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	-		
		HC08.H								■					■	■											■						<i>bla</i> _{CTX-M-15}	K7:A:-B-	170		
		HC11.H													■	■																	<i>bla</i> _{SHV-28}	ND	-		
		HC19.H													■	■																	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	K9:A:-B-	170		
		HVH40.H													■	■																	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	K7:A:-B- / IncR ^b	218		
		HVH48.H		■											■	■																		<i>bla</i> _{SHV-28}	ND	-	
		HVH50.H													■	■											■							<i>bla</i> _{SHV-28}	ND	-	
		HVH60.H													■	■																		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	K7:A:-B-	170	
														■	■																		<i>bla</i> _{CTX-M-15}	F2:A:-B-	145,5		
														■	■																		<i>bla</i> _{SHV-28}	ND	-		

Figura 47. Heat-map de las 49 cepas (32 *E. coli* y 17 *K. pneumoniae*) portadoras de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas de muestra fecal y hemocultivo. Los cuadros negros y blancos indican la presencia o ausencia, respectivamente, del factor en cuestión. Mo, microorganismo; Hemoc, hemocultivo; CP, carbapenemasa; ND, no determinado; ^a Genes *bla* detectados en el mismo plásmido; ^b Plásmidos donde la hibridación con las sondas de los replicones pertinentes tuvieron lugar en el mismo plásmido (plásmido híbrido).

5.6. Distribución de ST, fórmulas FAB y betalactamasas asociadas

Tal y como se describe en la metodología, se analizó la distribución, tanto por países como por genes *bla* asociados, de todas aquellas cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* procedentes de humanos con ST descritos de plásmidos IncN e IncI1 en la base de datos del pMLST. Adicionalmente, se compararon las fórmulas FAB del estudio con las de la base de datos del pMLST (<https://pubmlst.org/plasmid/>).

5.6.1. ST de plásmidos IncN

Según la base de datos del pMLST, actualmente, se listan un total de 49 cepas procedentes de humano con ST de plásmidos IncN (incluyendo nuestros 6 ST), 22 en *E. coli* y 27 en *K. pneumoniae* (Junio 2020).

El árbol (*GrapeTree*) generado para los ST IncN en *E. coli* (Fig. 48), muestra un total de 9 ST distintos; donde el ST1 es el predominante, con 13 plásmidos IncN procedentes de seis países distintos, incluyendo un ST1 del presente estudio (representado en verde en la Fig. 48A). Excepto por el plásmido de este estudio que se ha visto asociado a una SHV-12 y otros dos plásmidos asociados a CTX-M-32 en Grecia, el resto de ST1 han sido descritos en asociación con una CTX-M-1 (Fig. 48B). Aun así, hay que tener en cuenta que los datos de estos plásmidos ST1-CTX-M-1 son del año 2009.

Si tenemos en cuenta otras fuentes como perros, caballos, cerdos, vacas entre otros, tenemos un total de 82 ST IncN, de los cuales, el 78% (64/82) son ST1 y de estos, el 87,5% (56/64) se han publicado en asociación con una CTX-M-1.

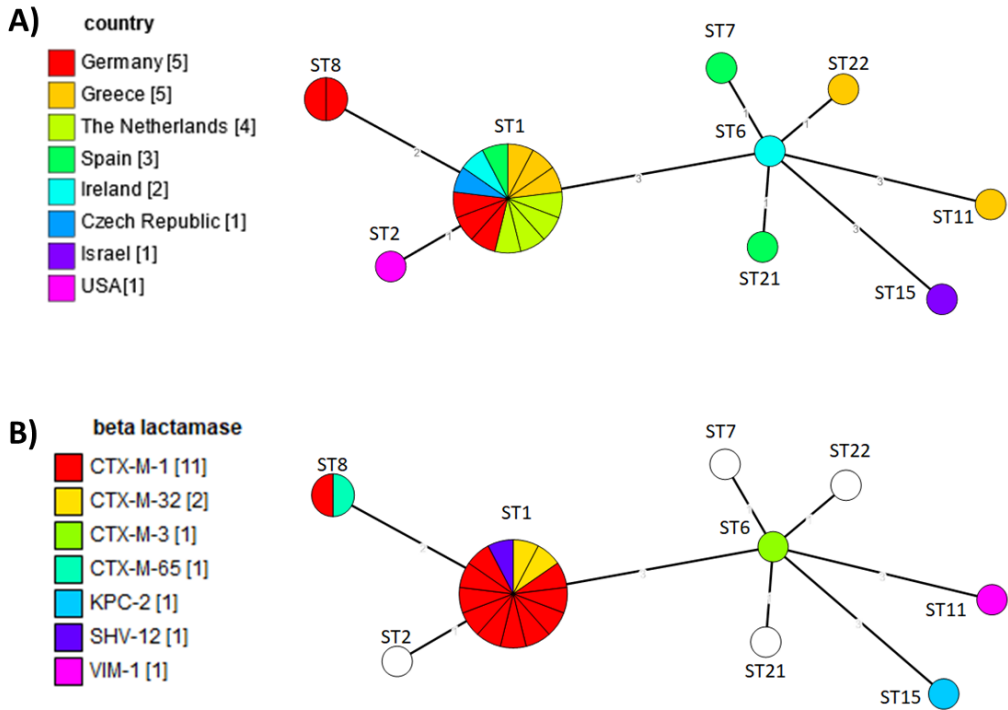


Figura 48. *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncN de *E. coli* aislados de humano. Se trata de un *Minimum spanning tree* basado en los perfiles alélicos de 22 plásmidos IncN. Los datos se descargaron de la página web del pMLST (<https://pubmlst.org/>). A) Se colorea según el país de aislamiento. La leyenda muestra el número de ST procedentes de cada país B) Se colorea según la betalactamasa que portan. La leyenda muestra el número de cada betalactamasa detectada. En blanco, ST de plásmidos sin betalactamasa asociada.

El *GrapeTree* generado para los ST IncN en *K. pneumoniae* (Fig. 49), muestra un total de 10 ST distintos, de los cuales, el ST11 es el predominante. Hay que tener en cuenta que todos los plásmidos ST11 proceden de Grecia, y se desconoce si se trata de un brote dado que, además, todos ellos están asociados a una VIM-1.

En este caso, aparte de un plásmido IncN de fuente desconocida procedente de Australia, no hay más plásmidos IncN con ST definido de cepas de *K. pneumoniae* publicados en la base de datos.

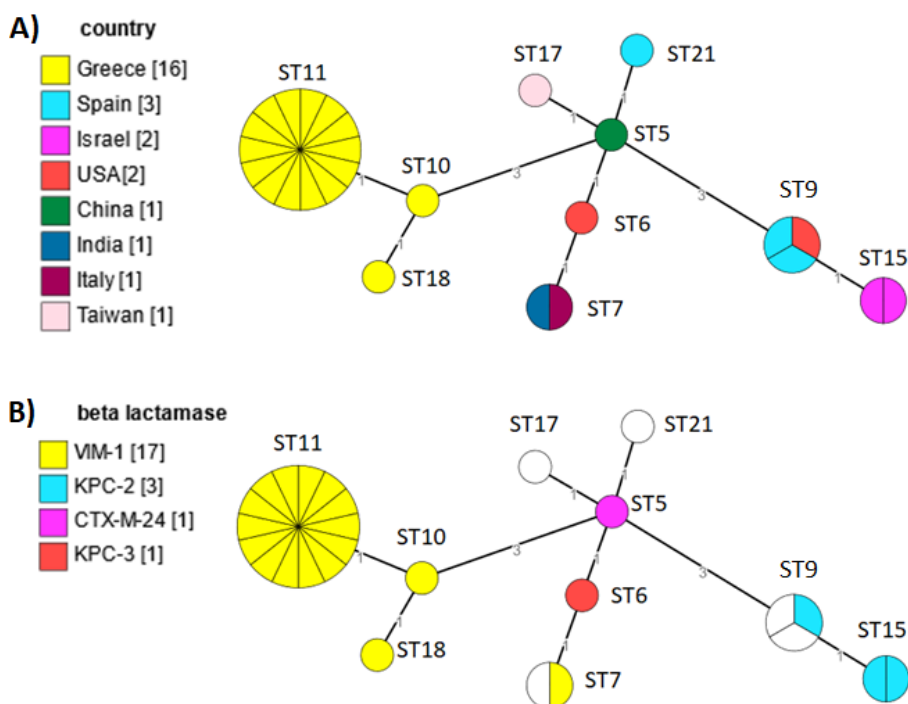


Figura 49. GrapeTree de los ST de plásmidos IncN de *K. pneumoniae* aislados de humano. Se trata de un *Minimum spanning tree* basado en los perfiles alélicos de 27 plásmidos IncN. Los datos se descargaron de la página web del pMLST (<https://pubmlst.org/>). A) Se colorea según el país de aislamiento. La leyenda muestra el número de ST procedentes de cada país B) Se colorea según la betalactamasa que portan. La leyenda muestra el número de cada betalactamasa. En blanco, ST de plásmidos sin betalactamasa asociada.

5.6.2. ST de plásmidos Inc11

Según la base de datos del pMLST, actualmente, se listan un total de 249 cepas procedentes de humano con ST de plásmidos Inc11 (incluyendo nuestros 45 ST), 238 en *E. coli* y 11 en *K. pneumoniae* (Junio 2020).

El GrapeTree generado para los ST de los plásmidos Inc11 en *E. coli* (Fig. 50), muestra una gran diversidad, con un total de 134 ST distintos; donde los ST2, ST3, ST7, ST12, ST16, ST26, ST31 y el ST36 son de los más frecuentes. De estos ST mayoritarios, los ST2, ST12, ST26 y ST36 fueron detectados en nuestro estudio (Fig. 50). El ST2 y el

ST26 sólo se detectaron en cepas fecales, en cambio el ST12 y ST36 se detectaron en cepas de *E. coli* de ambas poblaciones.

En general, de los 238 plásmidos IncI1 reportados por los distintos países, el 69,8% (166/238) se han publicado en asociación con algún gen *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV-12} o *bla*_{TEM-52}. Un dato para destacar es que estos ocho ST más prevalentes, se han detectado en distintos países y se han visto asociados, en su mayoría, a una única betalactamasa (Fig. 51). El ST2, por ejemplo, reportado desde cuatro países, aparece asociado únicamente a *bla*_{CMY-2}, excepto el plásmido ST2 perteneciente a nuestro estudio. El ST12 se detectó tres veces, dos en muestra fecal y una en hemocultivo y en los tres casos con el gen *bla*_{CMY-2} asociado. De los cuatro países que han aportado plásmidos ST12, incluyendo el nuestro, ha sido en asociación con el gen *bla*_{CMY-2} o libre de genes *bla*. El ST31, reportado por siete países, se ha asociado con *bla*_{CTX-M-15}; el ST3 con *bla*_{CTX-M-1}; el ST36 con *bla*_{TEM-52}; y los ST7, ST16 y ST26 a distintas variantes de *bla*_{CTX-M} y algún *bla*_{SHV} (Fig. 51).

Si tenemos en cuenta otras fuentes además de la humana, en la base de datos se listan un total de 573 *E. coli* con plásmidos IncI1 y 234 ST distintos.

El *Grapetree* de los ST de plásmidos IncI1 de *K. pneumoniae*, no fue generado dado que en la base de datos del pMLST, solo hay 11 plásmidos y, a excepción de dos ST255, los demás son ST distintos. Además, en este microorganismo tampoco hay más datos acerca de plásmidos IncI1 de aislados de otras fuentes.

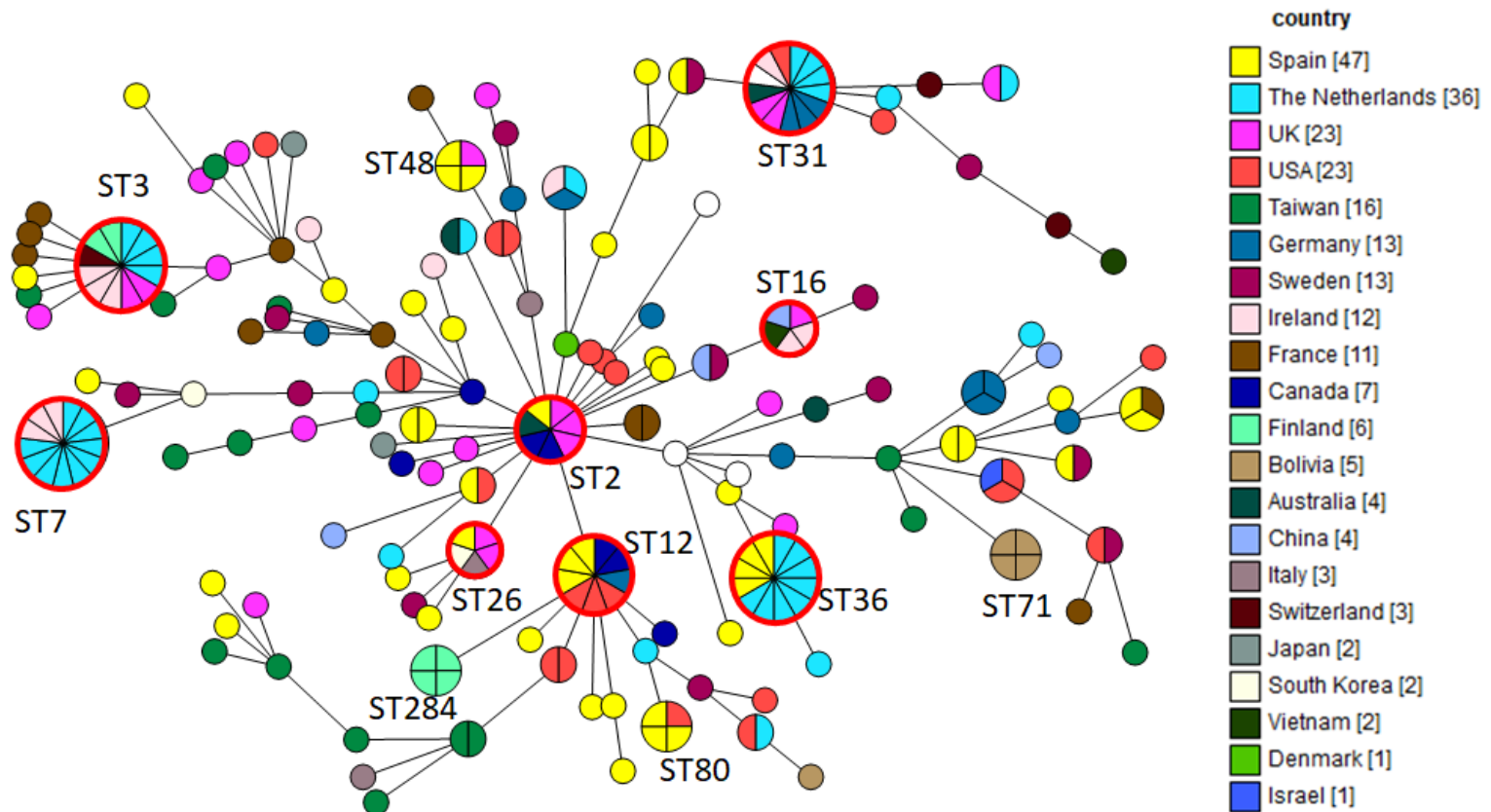


Figura 50. *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncI1 de *E. coli* aislados de humano coloreado según el país de aislamiento. Se trata de un *Minimum spanning tree* basado en los perfiles alélicos de 238 plásmidos IncI1. Los datos se descargaron de la página web del pMLST (<https://pubmlst.org>, Junio 2020). En blanco se representan los ST sin datos del país de origen. Resaltados en un círculo rojo, tenemos los ST más frecuentes. La leyenda muestra el número de ST de cada país. Los ST 101, 102, 103, 134 y 215 de España no son de este estudio (no se muestran marcados en la figura).

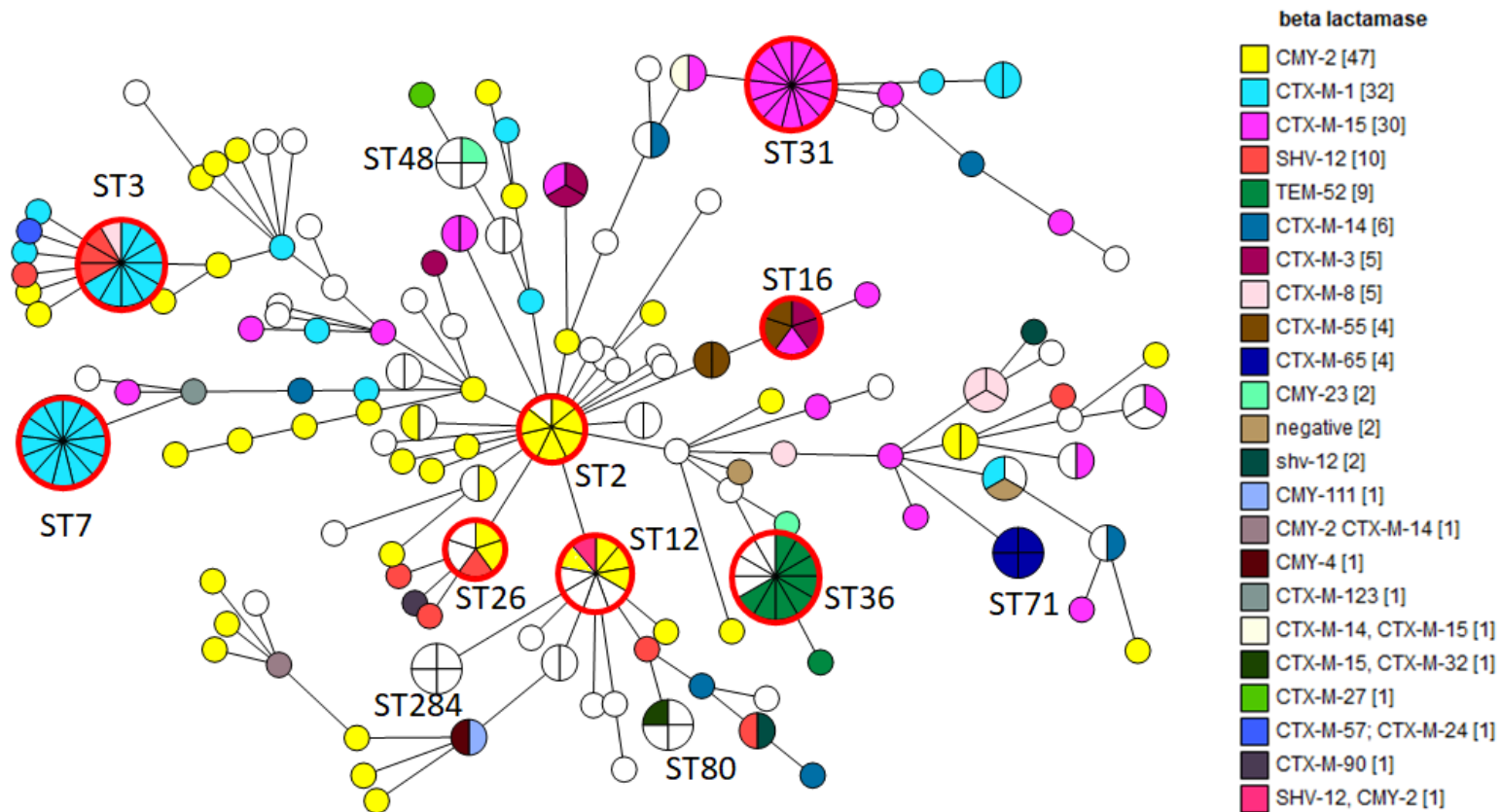


Figura 51. *GrapeTree* de los ST de plásmidos IncI1 de *E. coli* aislados de humano coloreado según la betalactamasa que portan. Se trata de un *Minimum spanning tree* (MST) basado en los perfiles alélicos de 238 plásmidos IncI1. Los datos se descargaron de la página web del pMLST (<https://pubmlst.org>, Junio 2020). En blanco se representan los ST sin betalactamasa asociada. Resaltados en un círculo rojo, tenemos los ST más frecuentes. La leyenda muestra el número de cada betalactamasa detectada.

5.6.3. FAB fórmulas de plásmidos IncF

En la base de datos del pMLST se listan 350 plásmidos con fórmula FAB procedentes de cepas de *E. coli* aisladas de humano (Junio 2020), de los cuales, el 54% (189/350) forman parte del presente estudio. En total hay 143 fórmulas FAB distintas, y solo nueve coinciden con alguna de las fórmulas de este estudio (Fig. 52). El sistema de subtipificación por presencia/ausencia de replicones, impide la generación del GrapeTree mediante MST, pero en la Figura 52 se muestran las fórmulas FAB más frecuentes y su país de origen. Algunas de las fórmulas destacables por su frecuencia y su detección en más de un país son: F2:A1:B-, F2:A-:B1, F2:B-:A-, F31:A4:B1, F22:A1:B20. Como se muestra en la Figura 52, y en la Figura 53 con más detalle, todas ellas se han descrito en más de una ocasión en asociación con algún gen de resistencia a betalactámicos.

Como se puede observar en la Figura 52, la mayoría de las fórmulas forman parte del presente estudio (amarillo) e, Irlanda (azul cielo), es el segundo país con más aportación de fórmulas.

Si descartamos fórmulas del presente estudio y las de procedencia irlandesa, obtenemos un total de 74 fórmulas FAB, el 77% (57/74) de las cuales han sido reportadas por su asociación a algún gen de resistencia a betalactámicos. En cambio, añadiendo España e Irlanda, este porcentaje es del 23% (81/350).

En total, se describen 58 fórmulas FAB distintas con genes *bla* asociados que representa el 41% (58/143) del total de fórmulas descritas, pero solo nueve de ellas han sido reportadas en más de una ocasión con algún gen *bla* asociado, siendo *bla*_{CTX-M-15} el gen más frecuente (Fig. 53).

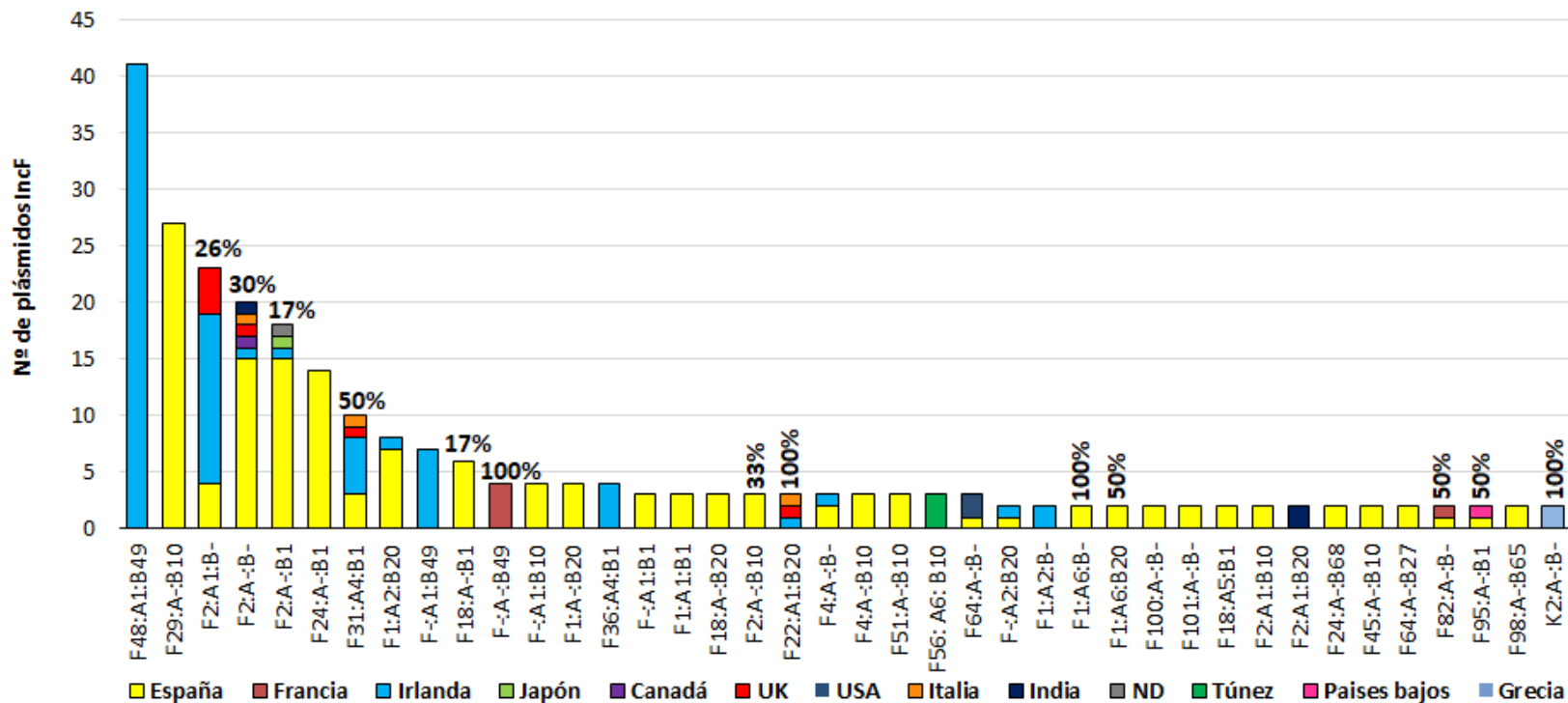


Figura 52. Fórmulas FAB más frecuentes en cepas de *E. coli* aisladas de humanos en la base de datos del pMLST. Se colorea según el país de procedencia de cada fórmula FAB. El porcentaje en la parte superior de las columnas muestra la proporción de aquellas fórmulas reportadas en asociación con algún gen de resistencia a betalactámicos (en detalle en la Fig. 53).

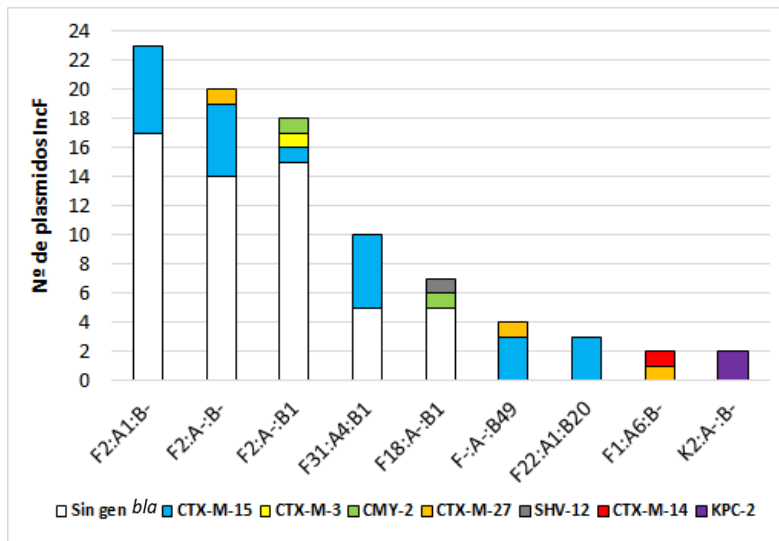


Figura 53. Fórmulas FAB con genes de resistencia a betalactámicos asociados, reportadas en más de un caso. Se colorea según el tipo de betalactamasa asociada. En blanco se muestran las fórmulas sin genes de resistencia a betalactámicos.

De las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de humano en la base de datos, se describen 91 plásmidos con fórmula FAB definida, de las cuales el 73,6% (67/91) forman parte del presente estudio. Hay un total de 22 FAB fórmulas distintas y solo siete de ellas están presentes tanto en nuestro estudio como en la base de datos (Fig. 54A).

Diez de las 22 FAB fórmulas se han detectado en asociación con algún gen de resistencia a betalactámicos, donde *bla*_{CTX-M-15} es el gen más frecuente seguido de *bla*_{KPC} (Fig. 54B).

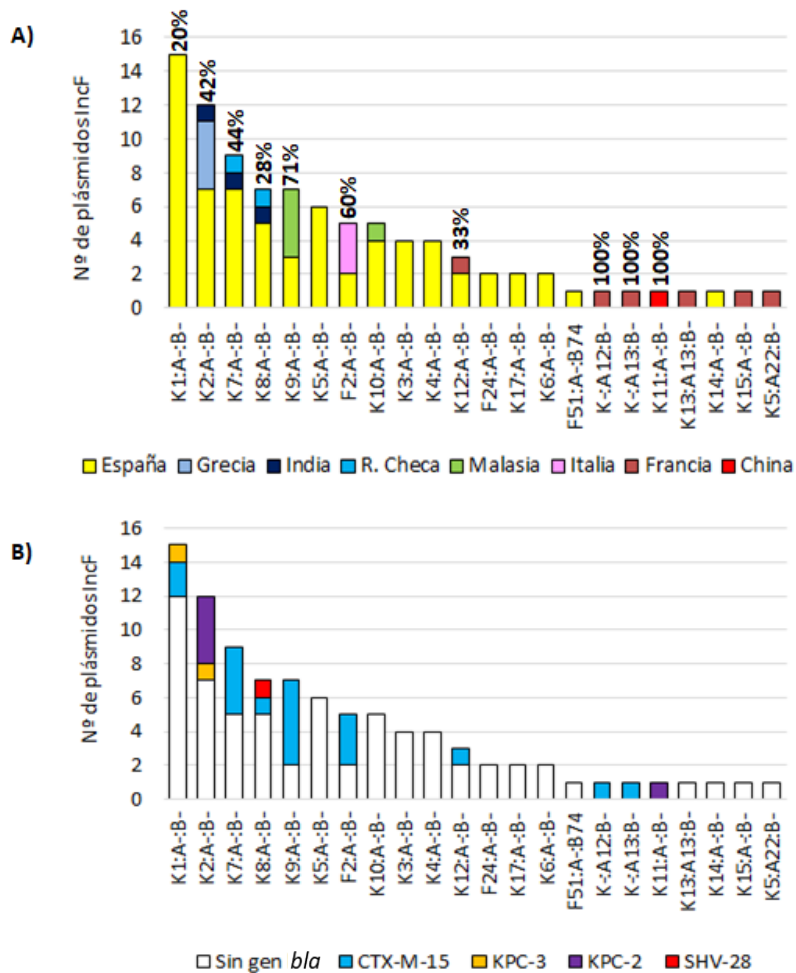


Figura 54. Formulas FAB en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de humano en la base de datos del pMLST. A) Se colorea según el país de procedencia. El porcentaje en la parte superior de las columnas muestra la proporción de aquellas fórmulas reportadas en asociación con algún gen de resistencia a betalactámicos. B) Se colorea según las betalactamasas asociadas.

5.7. Estudio de otras características en las cepas de *E. coli*

Además del contenido plasmídico de las distintas poblaciones en estudio, se analizaron otras características de las cepas como el grupo filogenético al que pertenecían y la presencia de determinados factores de virulencia. Con esta información, además de comparar estas características entre poblaciones, se

buscaba definir si existía alguna relación entre grupos filogenéticos, factores de virulencia y el contenido plasmídico.

Una de las limitaciones del estudio, fue el bajo número de cepas de *K. pneumoniae* obtenido de las muestras fecales de individuos sanos. Por ello, y por la gran heterogeneidad en el papel que desempeñan los FV en las cepas de *K. pneumoniae*^{25,27,28}, estos solo se estudiaron en las cepas de *E. coli*.

5.7.1. Grupos filogenéticos

Del total de cepas de *E. coli* (n=244), se encontró que los grupos filogenéticos mayoritarios fueron el B2 con un 50,8% de cepas, el D con un 13,1% y el A con un 10,6% (Tabla 18). Teniendo en cuenta la procedencia de las cepas, aunque existe una diferencia significativa entre poblaciones, observamos que el grupo filogenético B2 sigue siendo el mayoritario con un 40,7% en cepas de muestra fecale y un 65,7% en cepas de hemocultivo. Pero en las cepas fecales, los grupos filogenéticos más frecuentes, después del B2, fueron el A y el D, ambos con un 15,9% y, en las cepas de hemocultivo el B1, con un 11,1% (Tabla 18). En general, se observó una mayor diversidad de grupos filogenéticos en las cepas de muestra fecal, donde se detectaron cepas pertenecientes a todos los grupos filogenéticos, en comparación con las cepas de hemocultivo.

También se analizó cual era la distribución de grupos filogenéticos según si las cepas eran sensibles a todos los antimicrobianos evaluados o resistentes a alguno de ellos. Se observó que, de las cepas de hemocultivo, la mayoría tanto en resistentes como sensibles, se agrupaban en el grupo filogenético B2. En las cepas resistentes de muestra fecal ocurría lo mismo, en cambio, la distribución de grupos filogenéticos en las cepas sensibles resultó ser más homogénea (Tabla 18).

Tabla 18. Grupos filogenéticos detectados en las cepas de *E. coli* aisladas de muestra fecal y hemocultivo

		Grupos filogenéticos								
		A	B1	B2	C	D	E	F	Clado I	Unknown
Total <i>E. coli</i>	n=244 (%)	26 (10,6)	22 (9)	124 (50,8)	3 (1,2)	32 (13,1)	15 (6,1)	17 (6,9)	4 (1,6)	1 (0,41)
	n=145	23 (15,9) ^a	11 (7,6)	59 (40,7) ^b	3 (2,1)	23 (15,9)	8 (5,5)	13 (8,9)	4 (2,7)	1 (0,7)
Muestra fecal	S n= 71	16 (22,5)	1 (1,4)	24 (33,8)	3 (4,2)	10 (14,1)	7 (9,9)	9 (12,6)	1 (1,4)	0
	R n= 74	7 (9,5)	10 (13,5)	35 (47,3) ^c	0	13 (17,6)	1 (1,3)	4 (5,4)	3 (4,1)	1 (1,3)
	n= 99	3 (3) ^a	11 (11,1)	65 (65,7) ^b	0	9 (9,1)	7 (7,1)	4 (4)	0	0
Hemocultivo	S n= 9	0	1 (11,1)	6 (66,7)	0	2 (22,2)	0	0	0	0
	R n= 90	3 (3,4)	10 (11,1)	59 (65,5) ^c	0	7 (7,8)	7 (7,8)	4 (4,4)	0	0

S, cepas sensibles a todos los antimicrobianos evaluados; R, Cepas resistentes a ≥ 1 de los antimicrobianos evaluados.

^{a,b,c} Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas poblaciones y los distintos grupos filogenéticos.

Una vez determinado el grupo filogenético de todas las cepas de *E. coli*, se quiso definir si existía alguna relación significativa entre la presencia de los distintos replicones y el grupo filogenético de la cepa donde se detectaron. En la Tabla 19 podemos observar la distribución de cada uno de los replicones entre los distintos grupos filogenéticos y si existen relaciones significativas. Dado que se trata de una comparación múltiple, se aplicó la corrección de Bonferroni ajustando así el valor p a 0,007. De este modo, se observó que había una relación significativa entre el grupo filogenético F y la presencia del replicón FIB donde, un 94% de las cepas de este grupo filogenético presentaban el replicón en concreto, y también entre el grupo filogenético A y el replicón HI1 donde, a pesar de que el porcentaje de cepas A con este replicón no es mayoritario (15%), el 100% de HI1 se detectó dentro de este grupo (Tabla 19).

Tabla 19. Frecuencia de replicones y su distribución entre los grupos filogenéticos.

Replicón	Total ^a	Grupos filogenéticos						
		A (n=26)	B1 (n=22)	B2 (n=124)	C (n=3)	D (n=32)	E (n=15)	F (n=17)
CoIE	167	17 (65)	18 (81)	88 (71)	0	19 (59)	9 (60)	13 (74)
FII	178	10 (38)	19 (86)	94 (76)	2 (67)	24 (75)	10 (67)	16 (94)
FIB	157	9 (35)	16 (72)	87 (70)	3 (100)	17 (53)	7 (47)	16 (94)
FIA	46	1 (4)	3 (14)	31 (25)	0	4 (12)	1 (7)	3 (18)
I1	47	2 (8)	9 (41)	21 (17)	0	5 (16)	4 (28)	6 (35)
X1	47	5 (19)	2 (7)	24 (19)	0	9 (28)	5 (33)	2 (12)
B/O	18	2 (8)	1 (3)	8 (6)	0	1 (3)	2 (13)	4 (23)
K	24	3 (11)	5 (23)	13 (10)	0	0	2 (13)	1 (6)
X4	14	2 (8)	1 (3)	8 (6)	1 (33)	1 (3)	1 (7)	0
P	18	2 (8)	4 (14)	10 (8)	0	1 (3)	0	1 (6)
Y	9	6 (23)	0	1 (8)	0	1 (3)	0	1 (6)
HI1	4	4 (15)	0	0	0	0	0	0
X3	6	1 (4)	0	3 (2)	0	1 (3)	1 (7)	0
R	5	2 (8)	1 (3)	1 (0,8)	0	1 (3)	0	0
I2	5	0	0	2 (2)	1 (33)	1 (3)	0	0
N	4	2 (8)	0	2 (2)	0	0	0	0
M	2	0	0	1 (0,8)	0	0	1 (7)	0
A/C	1	0	0	1 (0,8)	0	0	0	0
HIB-M	3	1 (4)	1 (3)	1 (0,8)	0	0	0	0
FIC	2	0	2 (7)	0	0	0	0	0
FIK	1	1 (4)	0	0	0	0	0	0

Los datos se muestran numéricamente con el porcentaje entre paréntesis.

^a Número total de cepas positivas para cada replicón.

En negrita se señalan todos aquellos valores con $p \leq 0,05$. Los recuadros muestran las relaciones significativas después de la aplicación de la corrección de Bonferroni; verde, $p \leq 0,007$, asociación positiva entre el grupo filogenético y el replicón; rojo, $p \leq 0,007$, asociación negativa entre el grupo filogenético y el replicón.

5.7.2. Factores de virulencia

Los 15 factores de virulencia estudiados se detectaron en ambas poblaciones de *E. coli*. Como se esperaba, se observó una mayor diversidad y frecuencia de factores de virulencia en las cepas clínicas (de 9 a 15 FV), que en las cepas de muestra fecal (de 1 a 8 FV) (Fig. 55). Doce de los 15 factores de virulencia, incluyendo sideróforos,

toxinas, *hra*, *iss*, *ibeA* y *usp*, mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones (Fig. 55).

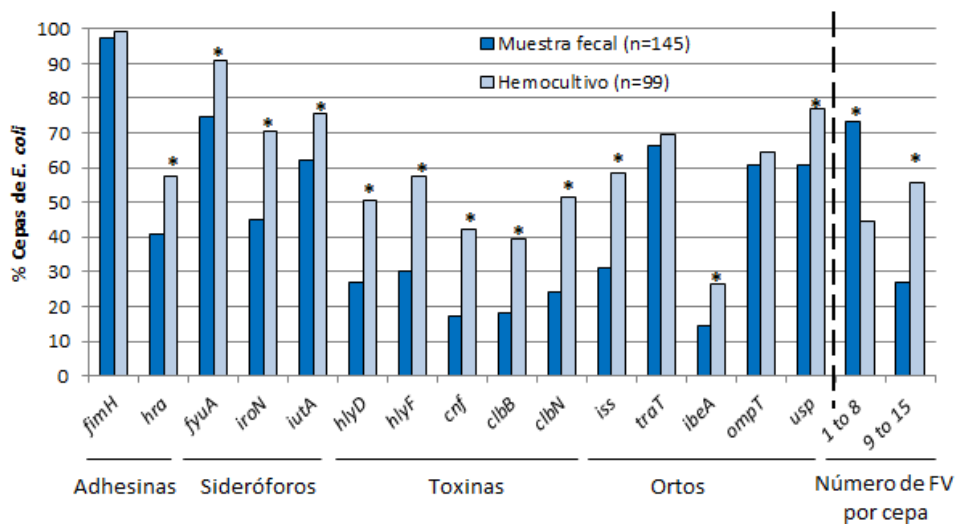


Figura 55. Frecuencia de los factores de virulencia analizados en las cepas de *E. coli* de muestra fecal y de hemocultivos, y porcentajes de cepas de *E. coli* según el número de factores de virulencia que portan.

Tanto en las cepas de muestra fecal como en las de hemocultivo, todos los FV se detectaron principalmente en el grupo filogenético B2 (Fig. 56). Dado que el grupo filogenético B2 resultó ser el mayoritario y, por lo tanto, no es de extrañar que la mayoría de factores de virulencia se agrupen en él, se hizo un análisis estadístico para determinar si este resultado era o no significativo. De este modo, se determinó que, aún y después de aplicar la corrección de Bonferroni ($p \leq 0,007$), existía una relación significativa entre el grupo filogenético B2 y 11 de los 15 factores de virulencia testados (Tabla 20).

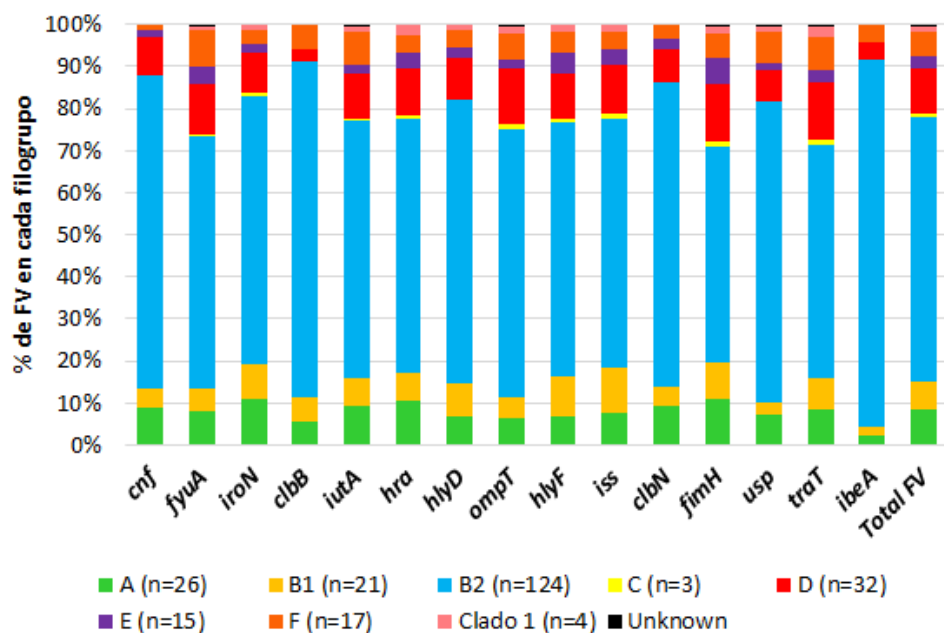


Figura 56. Distribución de los FV de las cepas de *E. coli* en cada uno de los grupos filogenéticos. Cada barra compara la contribución en porcentajes de cada FV entre los distintos grupos filogenéticos.

Tabla 20. Frecuencia de factores de virulencia y su distribución entre los grupos filogenéticos.

FV	Total ^a	Grupos filogenéticos						
		A (n=26)	B1 (n=22)	B2 (n=124)	C (n=3)	D (n=32)	E (n=15)	F (n=17)
<i>cnf</i>	67 (28)	6	3 (14)	50 (40)	0	6 (19)	1 (7)	1 (6)
<i>fyuA</i>	199 (83)	16 (61)	11 (50)	119 (96)	1 (33)	24 (75)	8 (53)	17 (100)
<i>iroN</i>	135 (53)	15 (58)	11 (50)	86 (69)	1 (33)	13 (41)	3 (20)	4 (23)
<i>clbB</i>	90 (38)	4 (15)	4 (18)	56 (45)	0	2 (6)	0	4 (23)
<i>iutA</i>	165 (69)	15 (58)	11 (50)	101 (81)	1 (33)	18 (56)	3 (20)	13 (76)
<i>hra</i>	116 (48)	12 (46)	8 (36)	70 (56)	1 (33)	13 (41)	4 (27)	5 (30)
<i>hlyD</i>	89 (37)	6 (23)	7 (32)	60 (48)	0	9 (28)	2 (13)	4 (23)
<i>ompT</i>	152 (64)	10 (38)	7 (32)	97 (78)	2 (67)	20 (62)	3 (20)	10 (59)
<i>hlyF</i>	103 (43)	7 (27)	10 (45)	62 (50)	1 (33)	11 (34)	5 (33)	5 (30)
<i>iss</i>	103 (43)	8 (31)	11 (50)	61 (49)	1 (33)	12 (37)	4 (27)	4 (23)
<i>clbN</i>	87 (36)	8 (31)	4 (18)	63 (51)	0	7 (22)	2 (13)	3 (18)
<i>fimH</i>	239 (100)	26 (100)	21 (95)	123 (99)	3 (100)	32 (100)	10 (100)	14 (82)
<i>usp</i>	165 (69)	12 (46)	5 (23)	118 (95)	0	12 (37)	3 (20)	12 (71)
<i>traT</i>	165 (69)	14 (54)	12 (54)	92 (74)	2 (67)	22 (69)	5 (33)	13 (76)
<i>ibeA</i>	47 (20)	1 (4)	1 (4)	41 (33)	0	2 (6)	0	2 (12)

Los datos se muestran numéricamente con el porcentaje entre paréntesis. En negrita se señalan todos aquellos valores con $p \leq 0,05$. Los recuadros muestran las relaciones significativas después de la aplicación de la corrección de Bonferroni; verde, $p \leq 0,007$, asociación positiva entre el grupo filogenético y el replicón; rojo, $p \leq 0,007$, asociación negativa entre el grupo filogenético y el replicón.

^a Número total de cepas positivas para cada FV.

Por último, se analizó la relación entre la presencia de factores de virulencia y la de replicones en una misma célula. En este caso, también se trata de una comparación múltiple, pero con mayor número de variables, así que al aplicar la corrección de Bonferroni se ajustó el valor p a 0,003. Se detectaron relaciones significativas entre los plásmidos ColE y el sideróforo *fyuA*, y entre plásmidos IncF y algunos factores como los sideróforos *fyuA* y *iutA*, la hemolisina *hlyF*, el factor de protección contra la fagocitosis *iss* y *traT*, inhibidor de la vía clásica del complemento (Tabla 21).

Tabla 21. Frecuencia de factores de virulencia en presencia de los distintos replicones detectados del estudio.

Replicones	Total	Factores de virulencia														
		<i>cnf</i> (n=67)	<i>fyuA</i> (n=199)	<i>iroN</i> (n=135)	<i>clbB</i> (n=70)	<i>iutA</i> (n=165)	<i>hra</i> (n=116)	<i>hlyD</i> (n=89)	<i>ompT</i> (n=152)	<i>hlyF</i> (n=103)	<i>iss</i> (n=103)	<i>clbN</i> (n=87)	<i>fimH</i> (n=239)	<i>usp</i> (n=165)	<i>traT</i> (n=165)	<i>ibeA</i> (n=47)
ColE	167	51 (76)	145 (73)	101 (75)	51 (73)	122 (74)	88 (76)	64 (72)	100 (66)	78 (76)	81 (78)	62 (71)	164 (68)	121 (73)	116 (70)	35 (74)
FII	178	54 (81)	152 (76)	104 (77)	52 (74)	131 (79)	85 (73)	68 (76)	112 (74)	86 (83)	87 (84)	63 (72)	173 (72)	127 (77)	142 (86)	38 (81)
FIB	157	47 (70)	141 (71)	95 (70)	49 (70)	126 (76)	73 (63)	60 (67)	104 (68)	81 (78)	81 (78)	57 (65)	153 (64)	112 (68)	126 (76)	37 (79)
FIA	46	12 (18)	40 (2)	23 (17)	14 (20)	40 (14)	29 (25)	19 (21)	33 (22)	17 (16)	19 (18)	17 (19)	44 (18)	32 (19)	37 (22)	12 (25)
II	47	10 (15)	40 (20)	22 (16)	12 (17)	29 (18)	19 (16)	18 (20)	24 (16)	24 (23)	23 (22)	12 (14)	46 (19)	26 (16)	31 (19)	13 (28)
X1	47	15 (22)	38 (19)	24 (18)	13 (18)	30 (18)	20 (17)	19 (21)	29 (19)	21 (20)	20 (19)	19 (22)	46 (19)	32 (19)	30 (18)	12 (25)
B/O	18	3 (4)	15 (7)	7 (5)	2 (3)	13 (8)	5 (4)	4 (4)	13 (8)	7 (7)	6 (6)	5 (6)	17 (7)	14 (8)	13 (8)	1 (2)
K	24	5 (7)	19 (9)	12 (9)	7 (10)	19 (11)	11 (9)	13 (15)	11 (7)	10 (10)	9 (9)	7 (8)	24 (10)	16 (10)	13 (8)	5 (11)
X4	14	3 (4)	12 (6)	9 (7)	4 (6)	10 (6)	6 (5)	7 (8)	12 (8)	7 (7)	6 (6)	6 (7)	14 (6)	11 (7)	12 (7)	2 (4)
P	18	6 (9)	15 (7)	12 (9)	5 (7)	12 (7)	9 (8)	6 (7)	9 (6)	9 (9)	10 (10)	6 (7)	18 (7)	12 (7)	14 (8)	4 (8)
Y	9	2 (3)	5 (2)	4 (3)	0	4 (2)	5 (4)	3 (3)	3 (2)	5 (5)	5 (5)	2 (2)	9 (4)	3 (2)	5 (3)	1 (2)
HI1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 (2)	0	1 (.6)	0
X3	6	1 (1)	5 (2)	2 (1)	1 (1)	4 (2)	2 (2)	1 (1)	4 (3)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	6 (3)	4 (2)	4 (2)	2 (4)
R	5	0	4 (2)	2 (1)	0	2 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (1)	2 (2)	1 (1)	1 (1)	5 (2)	1 (.6)	3 (2)	1 (2)
I2	5	1 (1)	5 (2)	2 (1)	1 (1)	4 (2)	3 (2)	2 (2)	2 (1)	3 (3)	3 (3)	1 (1)	5 (2)	2 (1)	3 (2)	0
N	4	1 (1)	2 (1)	3 (2)	1 (1)	3 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (.6)	1 (1)	2 (2)	1 (1)	4 (2)	2 (1)	2 (1)	1 (2)
M	2	1 (1)	1 (.5)	1 (.7)	1 (1)	1 (.6)	1 (1)	1 (1)	1 (.6)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (.8)	1 (.6)	2 (1)	0
A/C	1	1 (1)	1 (.5)	1 (.7)	1 (1)	0	1 (1)	1 (1)	0	0	0	1 (1)	1 (.4)	1 (.6)	0	0
HIB-M	3	1 (1)	2 (1)	2 (1)	1 (1)	2 (1)	3 (2)	2 (2)	1 (.6)	0	1 (1)	1 (1)	3 (1)	2 (1)	3 (2)	0
FIC	2	1 (1)	2 (1)	2 (1)	2 (3)	2 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (.6)	2 (2)	2 (2)	2 (2)	3 (1)	2 (1)	3 (2)	1 (2)
FIHK	1	0	1 (.5)	1 (.7)	0	1 (.6)	1 (1)	0	0	0	0	0	1	1 (.6)	1 (.6)	0

Los datos se muestran numéricamente con el porcentaje entre paréntesis. En negrita se señalan todos aquellos valores con $p \leq 0,05$. Los recuadros muestran las relaciones significativas después de la aplicación de la corrección de Bonferroni; verde, $p \leq 0,003$, asociación positiva entre el replicón y factor de virulencia; rojo, $p \leq 0,007$, asociación negativa entre replicón y factor de virulencia.

A stylized graphic of a DNA double helix in yellow, positioned behind the text. The helix is partially obscured by the text and features a solid yellow line and a dashed yellow line.

6. Discussion

Los plásmidos se definen como moléculas de ADN de doble cadena, principalmente circulares, extracromosómicas y con la peculiaridad de replicarse de forma autónoma. Son moléculas de gran flexibilidad y dinamicidad genética, debido en parte, al movimiento de elementos transponibles y secuencias de inserción, pudiendo tanto desechar como adquirir multitud de genes con distintas funciones y procedencias sin afectar a su correcto funcionamiento^{84,162,163}. No codifican para genes esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto, su importancia en el mundo bacteriano radica en la aportación de una batería adicional de genes que les confieren cierta ventaja adaptativa en situaciones ambientales adversas^{163,164}.

Otra característica importante de los plásmidos es su capacidad de transferencia, tanto vertical como horizontal. La transferencia horizontal de genes es la base de la diversidad genética bacteriana, y los plásmidos son uno de los principales vehículos que impulsan este proceso^{164,165}. La adquisición de estos genes, listos para usar, acelera y facilita la adaptación a nuevos entornos sin depender de que, aleatoriamente, se dé alguna mutación espontánea beneficiosa en la población que se mantenga entre generaciones¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

En el campo de la salud humana, el principal papel desempeñado por los plásmidos, y por el cual en las últimas décadas es considerado un problema sanitario de escala global, es el de difusión y propagación de genes de resistencia a antimicrobianos entre los principales patógenos de importancia clínica¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Además, la resistencia a antimicrobianos adquirida mediante plásmidos es una de las causas más frecuentes de multiresistencia, estado que limita las opciones terapéuticas y facilita la selección y persistencia de las bacterias que los poseen¹⁷².

Si bien es cierto que los plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica de aislamientos causantes de infección han sido extensamente estudiados^{73,173-175}, el conocimiento acerca de los plásmidos presentes comúnmente en la microbiota comensal es más limitado. De este modo, el propósito de este estudio va dirigido a dar a conocer cuál es el contenido plasmídico de cepas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) comensales de individuos sanos y determinar si existen similitudes o diferencias con

aquellos plásmidos detectados en cepas causantes de infección. Todo esto, independientemente de si son plásmidos portadores o no de genes de resistencia a antimicrobianos.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además de ser bacterias comensales del tracto gastrointestinal, son uno de los agentes causales de infecciones oportunistas más importantes. Según la OMS, tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* son microorganismos que se encuentran dentro de la categoría de prioridad crítica dada su frecuente detección como bacterias multirresistentes especialmente peligrosas en ámbitos clínicos (<https://www.who.int/es>). Dada su alta frecuencia de aislamiento como agentes causales de infección y su importancia en la clínica como patógenos MDR, ambos microorganismos fueron seleccionados para el estudio de su contenido plasmídico.

6.1. Perfil de sensibilidad y multiresistencia

Antes de entrar en detalle en el análisis de plásmidos presentes en las cepas de estudio, se determinaron cuáles eran los perfiles de sensibilidad tanto de las cepas aisladas de heces de individuos sanos como de las cepas causantes de bacteriemia. De la batería de antimicrobianos utilizados, betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol, la resistencia a betalactámicos resultó ser la más prevalente en ambas poblaciones y microorganismos de estudio. De hecho, la resistencia a betalactámicos es una de las más comunes en ambas especies, la producción de betalactamasas constituye el principal mecanismo de resistencia y, la transferencia horizontal, el método de adquisición más común^{32,63,176}. Es por esto por lo que, el presente estudio, se ha centrado principalmente en la detección de estas betalactamasas.

En la Figura 57 de la discusión, se representa la prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a algunos de los fármacos de estas cuatro familias de antimicrobianos, tanto del presente estudio (azul, naranja y gris) como de otros estudios de distintos países y muestras de aislamiento¹⁷⁷ (amarillo, lila, verde). Lo primero que podemos extraer de los resultados del presente estudio es que, la prevalencia de cepas clínicas

resistentes a prácticamente cualquiera de los fármacos (naranja) es significativamente superior que la de cepas de individuos sanos (azul). En el ambiente hospitalario encontramos una población de individuos especialmente susceptible de contraer infecciones (por intervenciones quirúrgicas, enfermedades subyacentes o inmunodepresión) además, de ser uno de los principales focos de contacto directo con antimicrobianos e infecciones nosocomiales por cepas resistentes. Además, normalmente, las cepas causantes de infección acostumbran a ser más virulentas y a portar más genes de resistencia¹⁷⁸ (<https://www.cdc.gov>, <https://www.ecdc.europa.eu/>). Por lo tanto, no es de extrañar que exista tal diferencia entre ambas poblaciones en estudio. Sin embargo, la prevalencia nada despreciable de cepas resistentes en la microbiota intestinal de individuos sanos es más alarmante, dado que, como bien se describe en la literatura¹⁷⁹, se trata de un reservorio y foco de transmisión que podría devenir en infecciones oportunistas de difícil tratamiento.

Comparando ahora (Fig. 57), nuestros resultados de ambos tipos de muestra (gris) con los de humanos de otros estudios (amarillo, procedentes tanto de muestras clínicas como de voluntarios) observamos diferencias más o menos pronunciadas en las prevalencias de cepas resistentes a cada fármaco. Esto no es de extrañar ya que la prevalencia de cepas resistentes puede variar según el país, debido a distintas políticas de administración de fármacos, o al tratamiento con antibióticos que se aplique en animales de consumo y, por consecuente, al tipo de alimentación que haya en cada región, además del año en el que se hayan tomado las muestras y el tipo de estas. De este modo, podemos encontrar que, en un mismo país (ej. España), la prevalencia de cepas resistentes, por ejemplo a CTX, en aislados de muestra clínica fuera de 0,5%¹⁸⁰ en 1999 y de 20,2% en 2014 (presente estudio); y, del mismo modo, en cepas de muestra fecal de individuos sanos con un 0%¹⁸⁰ y un 9%, respectivamente, detectando un claro aumento de cepas resistentes a lo largo del tiempo. Otro factor importante que influiría en la gran diferencia en la prevalencia de cepas resistentes a cefalosporinas como, CEP, CTX y CAZ, sería el gran número de artículos dirigidos principalmente al estudio de cepas, clínicas o no, portadoras de

BLEE. Por este motivo, al omitir el sesgo de selección de cepas por su resistencia a antimicrobianos, nuestros resultados dan una prevalencia más objetiva.

Por otro lado, también cabe destacar, el paralelismo existente entre las cepas resistentes en humanos, en general, y las cepas aisladas de animales, alimentos y ambientes; observando cómo todas las resistencias a los antimicrobianos mostrados en la Figura 57 se detectan en todos los tipos de muestra (a excepción de la resistencia a IMI no detectada en ninguna cepa de *E. coli* del presente estudio).

Los agentes antimicrobianos se usan en animales y humanos, de forma terapéutica y preventiva, para el control de infecciones bacterianas; además, frecuentemente son incorporados en alimentos para ganado y aves a dosis subterapéuticas para promover su crecimiento. Tanto el contacto directo con estos animales, como el consumo de productos derivados de estos, o bien con el ambiente donde se mantienen confinados y alrededores, podría contribuir a la adquisición de resistencias antimicrobianas por el ser humano¹⁸¹⁻¹⁸⁴. De hecho, se ha comprobado cómo en animales y ambientes salvajes, los cuales no se encuentran expuestos intencionadamente a grandes cantidades de agentes antimicrobianos, muestran prevalencias de resistencia muy inferiores¹⁸⁵. Esto sugiere, que la exposición de la microbiota comensal intestinal a agentes antimicrobianos, promueve la selección de cepas resistentes, y que puede existir cierta transmisión de estas distintas fuentes expuestas a otras que no lo estén^{179,186}, tal y como hemos podido observar en los individuos sanos, sin exposición directa a antibióticos, del presente estudio.

En general, observamos que la familia de betalactámicos es la que presenta una prevalencia de resistencias más alta, exceptuando los carbapenémicos (Fig. 57). Además de los betalactámicos, las resistencias a quinolonas, aminoglucósidos y sulfamidas también representan una fracción importante en las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. De hecho, a nivel clínico, la principal problemática es la infección por cepas resistentes a distintos antimicrobianos de estas familias.

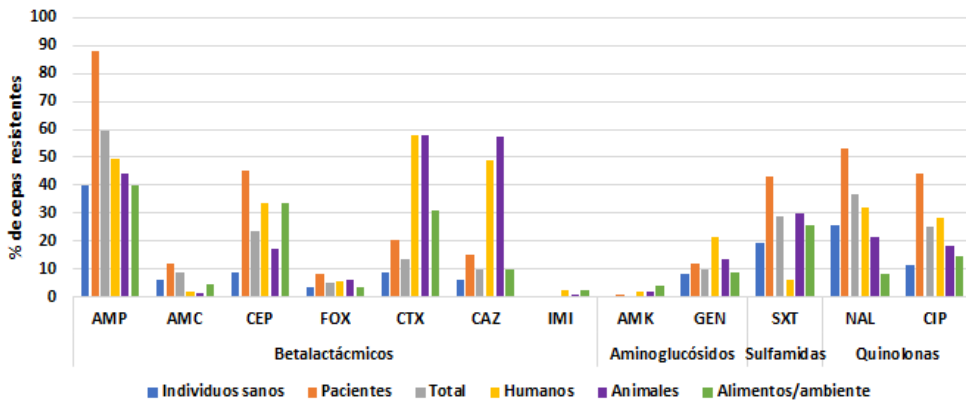


Figura 57. Prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos. En azul, naranja y gris se muestran los datos del presente estudio; en amarillo, lila y verde los datos recopilados de distintos estudios por Pormohammad *et al*¹⁷⁷.

AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; CEP, cefalotina; FOX, cefoxitina; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; IMI, imipenem; AMK, amikacina; GEN, gentamicina; SXT, co-trimoxazol; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina.

En el presente estudio, se observaron porcentajes de multiresistencia de 38,4% en *E. coli* y 20,4% en *K. pneumoniae* causantes de bacteriemia (29,2% en total). En un estudio realizado por Diekema *et al.*¹⁸⁷, a escala global, donde se recolectaron cepas causantes de bacteriemia de más de 200 centros médicos de 45 países distintos (1997-2016), se observó como *E. coli* (20,5%) y *K. pneumoniae* (7,7%) (después de *S. aureus*, 20,7%) fueron los microorganismos más prevalentes. En este mismo estudio, se observó que la prevalencia de enterobacterias MDR causantes de bacteriemia entre los años 2013 y 2016 fue de 15,8%¹⁸⁷. Este porcentaje es un 13,4% inferior a la prevalencia de cepas MDR de *E. coli* y *K. pneumoniae* de nuestro estudio; no obstante, se debe tener en cuenta que, en nuestro estudio y tal y como se ha comentado anteriormente, estos dos microorganismos son dos de los más prevalentes en este tipo de infección debido a su alta frecuencia como multirresistentes, por lo consecuente, no es de extrañar que el porcentaje obtenido sea superior. A pesar de que la multiresistencia está muy bien estudiada en cepas causantes de infección, la información existente acerca de la prevalencia de

enterobacterias comensales MDR en individuos sanos es más limitada. En nuestro estudio, el 10,3% de cepas de *E. coli* y 16,4% de *K. pneumoniae* fecales resultaron MDR (10,8% en total). En otros países como la India, se observaron prevalencias de entre 25% y 41% según la región (datos sobre individuos sanos, 2015-2017, aunque algunos de ellos fueron tratados con antibióticos las tres semanas previas a la recolección)¹⁸⁸ y, en Polonia del 31% (muestras recolectadas durante 2012-2015)¹⁸⁹. Los datos de cepas comensales MDR, aparte de escasos, son muy variables entre países y entre regiones de un mismo país. Sería necesario un estudio más profuso para conocer el alcance y gravedad de esto, ya que se trata de un reservorio de multiresistencia importante que puede causar multitud de infecciones de difícil tratamiento.

La mayoría de autores han relacionado la multiresistencia en enterobacterias con la presencia de betalactamasas adquiridas, en especial las BLEE, AmpC y carbapenemasas^{190,191}. De hecho, en el presente estudio, el 76,5% y 61% de las cepas MDR aisladas de individuos sanos y pacientes, respectivamente, eran productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas. Además, se ha descrito que las cepas productoras de estas enzimas también presentan, normalmente, altos niveles de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y a cotrimoxazol^{172,190,192}. En nuestro estudio, se pudo observar que el 85,7% de las cepas productoras de BLEE, AmpC y/o carbapenemasas, mostraron también resistencia a antimicrobianos de una, dos o tres de estas familias. Este porcentaje fue similar al descrito por Cakir *et al.*¹⁹⁰, donde el 88,2% de las cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (ámbito clínico), resultaron resistentes mínimo a uno de los fármacos de estas familias. En cambio, de las cepas no BLEE, solo el 40,5% resultó resistente a alguno de los fármacos de estas familias, porcentaje algo superior que el de nuestro estudio, que fue de 32,9% y, omitiendo las cepas de individuos sanos, de 35,5%. Esto nos confirma que, existe una asociación entre la producción de estas enzimas y la resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y cotrimoxazol.

6.2. Portadores sanos de BLEE y AmpC

Las primeras cepas de enterobacterias productoras de BLEE se observaron casi exclusivamente en hospitales, especialmente en unidades de cuidados intensivos, donde se generaban brotes a gran escala¹⁹³. No fue hasta finales del año 1990, poco después de que las patentes de cefalosporinas de espectro extendido fueran de dominio público, que surgieron infecciones adquiridas en la comunidad y, por consecuencia, la presencia de portadores sanos de enterobacterias productoras de BLEE^{194,195}.

En el presente trabajo, la prevalencia de portadores sanos de cepas de *E. coli* productoras de BLEE fue de 4,7%. Este porcentaje de portadores es superior al detectado en Barcelona en años anteriores (2001-2002), el cual fue de 3,3%¹⁹⁶. En un trabajo publicado en 2013, donde se recopilan datos de distintos estudios de portadores fecales entre el 2002 y el 2011, describen como la tasa de portadores de enterobacterias productoras de BLEE en Europa (*E. coli* y *K. pneumoniae*, principalmente), aumenta un 0,5% por año^{176,197}. Comparando la prevalencia de portadores de nuestro estudio (4,7%) con el de Miró *et al.* (3,3%)¹⁹⁶, la tasa de portadores en Barcelona, desde 2001 a 2014 (año de recolección de nuestras muestras), ha aumentado un 0,1% por año. Sin embargo, el 4,7% de portadores obtenido, fue similar a la tasa de portadores sanos reportados por otros autores en años cercanos a la recolección de las cepas de nuestro estudio, con un 4,7% en Suecia (2013) y un 4,9% en Noruega (2014-2016)^{198,199}. Además, el porcentaje de portadores sanos obtenido se encuentra dentro del promedio de 3-6% europeo²⁰⁰.

Aun así, cabe destacar el claro aumento de portadores de enterobacterias productoras de BLEE en España, con un 3,3% en uno de los primeros estudios de portadores en la comunidad (2001-2002) y años más tarde (2016) con porcentajes de hasta 7,7% en Madrid¹⁹⁷.

La información referente a los portadores de AmpC es más limitada y, aunque representan un mecanismo de resistencia importante, son menos frecuentes que las BLEE¹⁹⁹. La prevalencia de portadores sanos de cepas de *E. coli* productoras de AmpC

en el presente estudio fue de 2,7%, porcentaje superior al detectado en otro estudio en España en 2014, donde se detectó una prevalencia del 0,6%. Aun así, este último estudio de portadores se realizó en pacientes hospitalizados y, actualmente, no hay más datos de portadores en el país²⁰¹. Nuestro resultado, si es comparable con el porcentaje de portadores de AmpC detectado en Noruega en 2016, el cual fue de 3,2%¹⁹⁹.

6.3. Cepas clínicas productoras de BLEE, AmpC y carbapenemasas

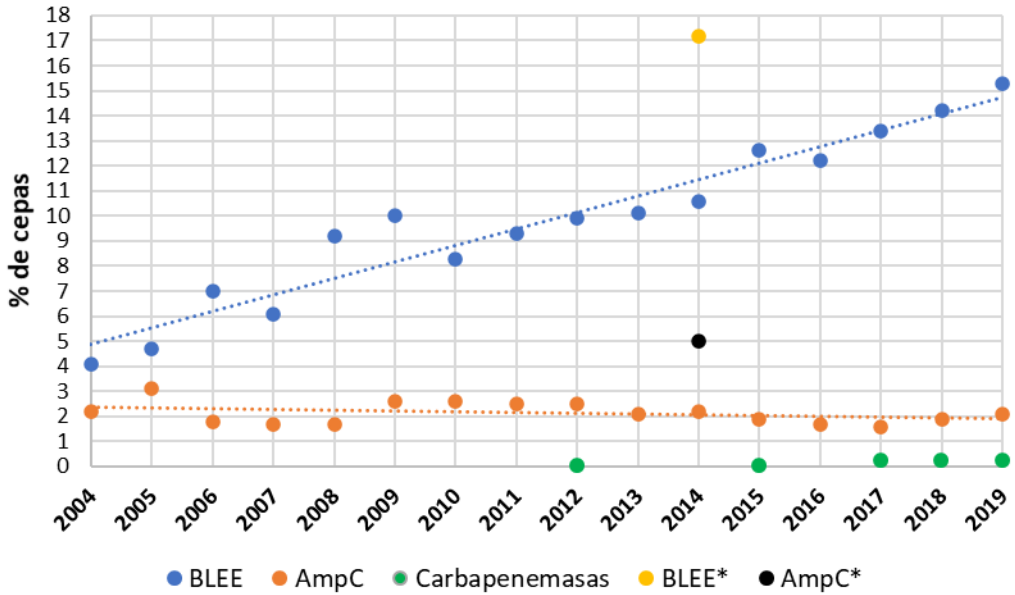
Referente a las cepas clínicas causantes de infección, la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE o AmpC detectada en el presente estudio fue de 17,2% y 5%, respectivamente. Estos porcentajes resultaron superiores a los detectados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, tanto en el año 2014 (10,6% BLEE, 2,2% AmpC), año de recolección de las cepas del presente estudio, como en 2019 (15,3% BLEE, 2,1% AmpC) (<http://www.santpau.cat/web/public/resums-de-sensibilitat>). Esta diferencia, podría deberse a que nuestros datos solo recogen aquellas cepas causantes de bacteriemia, en cambio, los datos del hospital recogen una gama más amplia de infecciones, unas con mayor y otras con menor prevalencia de cepas resistentes²⁰². Aun así, como podemos observar en la Figura 58A, la cual describe el porcentaje de cepas productoras de BLEE, AmpC o carbapenemasas del hospital de Sant Pau por anualidad, existe una tendencia creciente a la detección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, porcentajes estables de AmpC que oscilan entre 1,7 y 3,1% con un ligero descenso en los últimos 4 años, y casos puntuales de cepas productoras de carbapenemasas.

En las cepas clínicas de *K. pneumoniae* del presente estudio, se observaron prevalencias de producción de BLEE del 16,5%, un 1% de AmpC y un 1,9% de carbapenemasas. Los porcentajes de BLEE en 2014 del Hospital de Sant Pau son similares (16,7%) y los de AmpC y carbapenemasas ligeramente superiores (3,4% y 3%, respectivamente). Del 2014, año de recolección de las muestras, al 2019, se puede observar cómo la detección de cepas productoras de BLEE se duplica (Fig. 58B). Aunque su detección anual es creciente, no sigue un patrón lineal (Fig. 58B). El

comportamiento oscilante podría deberse a anualidades con brotes y periodos de detección de cepas aisladas. Por otro lado, tanto las cepas productoras de AmpC como de carbapenemasas, se han ido detectando con mayor frecuencia a lo largo de los años (Fig. 58B).

En el estudio de Diekema *et al.*¹⁸⁷, donde se analizaron cepas causantes de bacteriemia de 45 países distintos durante 1997-2016, también se observó una tendencia creciente de cepas productoras de estas enzimas. En el último periodo que describen, 2013-2016, se alcanzaron prevalencias de 21% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, 32% de cepas de *K. pneumoniae* y un total de 3%, aproximadamente, de cepas de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos (Fig. 59); valores similares a los de nuestro estudio y a los datos del Hospital de Sant Pau en ese período de tiempo.

A) *Escherichia coli*



B) *Klebsiella pneumoniae*

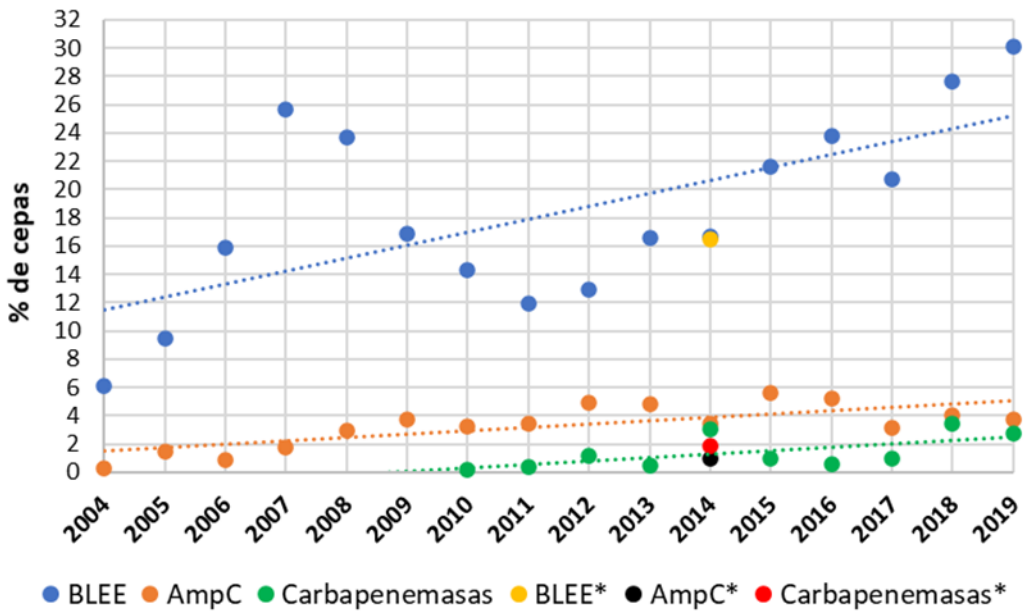


Figura 58. Porcentaje de cepas de A) *E. coli* y B) *K. pneumoniae* productoras de BLEE, AmpC o carbapenemasas aisladas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau por anualidad (del 2004 al 2018).

*Porcentaje de cepas del presente estudio.

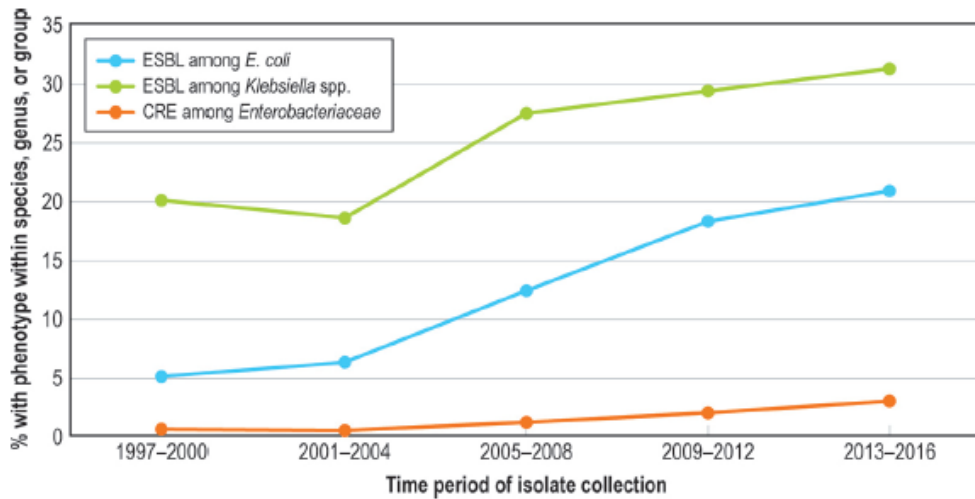


Figura 59. Tendencia en veinte años del porcentaje de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productoras de BLEE y enterobacterias productoras de carbapenemasas, 1997 a 2016. Figura extraída de Diekema *et al.* 2019¹⁸⁷.

6.4. Caracterización de BLEE, AmpC y carbapenemasas

La caracterización de estos genes de las cepas en estudio, determinó que las BLEE detectadas con mayor frecuencia tanto en la población sana (a excepción de las cepas de *K. pneumoniae* en las que no se detectó ninguna BLEE), como en la clínica, fueron las CTX-M, con un porcentaje sobre el total de BLEE de 88,5% en *E. coli* y 64,7% en *K. pneumoniae*. Dentro de esta familia de BLEE, la CTX-M-15 fue la predominante. El predominio de las CTX-M no es de extrañar ya que, actualmente, son las BLEE más comunes y difundidas a escala global entre la familia *Enterobacteriaceae*. Además, aun y existir múltiples variantes dentro de esta familia de BLEE, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14} son, actualmente, las mayoritarias, encontrándose en todo tipo de ambientes, tanto aguas, animales, alimento y ámbitos hospitalarios^{50,63,64}. En el presente estudio, una de las cepas de *E. coli* de muestra fecal resultó ser portadora de estas dos BLEE, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-14}, localizándose ambas en un mismo plásmido (Incl1 ST170). Algunos autores han descrito este mismo evento con la misma combinación de CTX-M o distintas, pero se desconoce cuál es la ventaja que esto podría o no proporcionar a estas cepas, ni de si esto puede

tener repercusiones clínicas. En uno de estos estudios²⁰³, se detectó la presencia de más de un tipo de *bla*_{CTX-M} en diez aislados de *E. coli* procedentes de distintas muestras de perros y gatos sanos: *bla*_{CTX-M-55, -64 y -14} (n=1), *bla*_{CTX-M-55 y -14} (n=6), *bla*_{CTX-M-55 y -65} (n=1), *bla*_{CTX-M-55 y -9} (n= 1), *bla*_{CTX-M-64 y -14} (n= 1). En este mismo estudio se realizaron ensayos de conjugación para determinar si estos genes eran transferibles, pero no se determinó el tipo de plásmido. En otro estudio²⁰⁴ con cepas de *E. coli* procedentes de muestra de aguas de lagos y ríos, se identificaron 22 cepas con más de un gen *bla*_{CTX-M} pero tampoco se estudió su localización.

Por otro lado, la CMY-2 fue la AmpC mayoritaria en las cepas de *E. coli* de ambas poblaciones, con un porcentaje sobre el total de AmpC del 90%. Se trata de la variante de AmpC reportada con mayor frecuencia en cepas de *E. coli*^{69,205}, encontrando porcentajes similares al de nuestro estudio en cepas de *E. coli* clínicas de otros países, como Canadá con un 96%²⁰⁶, Noruega con un 92%²⁰⁷ o Japón con un 95%²⁰⁸. Las AmpC, generalmente, son menos prevalentes que las BLEE en *Enterobacteriaceae*. En Italia, un país endémico de Enterobacteriales resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, se encontró que la relación ESBL/AmpC era aproximadamente 12:1²⁰². Aun así, el número de aislamientos de estas cepas cada vez es mayor y, al igual que las BLEE, también presentan una amplia difusión a nivel mundial, siendo detectadas en microorganismos de distintos orígenes, como aguas, suelos o animales^{69,73}.

Las carbapenemasas, mucho menos frecuentes que las betalactamasas anteriores, pero con una detección creciente tal y como hemos observado anteriormente tanto en el Hospital de Sant Pau como a nivel mundial, se identificaron solo en *K. pneumoniae* de muestra clínica y fueron de tipo KPC-3. Dentro de la familia de carbapenemasas de tipo KPC, KPC-3 y KPC-2, junto con OXA-48 y NDM, son de las más comunes entre los aislados clínicos y representan la principal causa de los brotes hospitalarios por cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas^{75,202,209-211}.

6.5. Estudio de plásmidos (Inc/rep)

Uno de los principales motivos por los cuales todas estas betalactamasas presentan esta gran difusión a nivel mundial, encontrándose en bacterias de distintas especies y géneros además de tener distintas procedencias, es que a menudo, se encuentran asociadas a elementos genéticos móviles. Como se ha comentado anteriormente, el principal elemento genético de transferencia horizontal y, por lo tanto, de difusión de genes de resistencia a antimicrobianos son los plásmidos^{106,107}. De este modo, una vez conocido el perfil de resistencia y habiendo ya caracterizado los genes BLEE, AmpC y carbapenemasas de nuestras cepas, el siguiente paso fue el de conocer cuál era el contenido plasmídico de ambas poblaciones y especies bacterianas en estudio.

El total de replicones identificados en las 359 cepas en estudio fue de 975, con una media de 3,1 replicones en las cepas de *E. coli* y de 1,8 en las de *K. pneumoniae*. Dado que un único plásmido puede albergar más de un replicón, el número de replicones detectado no es equivalente al número de plásmidos por cepa. Este resultado está en discordancia con la publicación de Wyres *et al.*²¹², en la que describen una media de plásmidos de uno en *E. coli* y tres en *K. pneumoniae* utilizando el número de replicones de plásmidos anotados en todas las secuencias genómicas completas en NCBI GenBank.

En el presente estudio, se observó que los replicones y los plásmidos más frecuentes fueron aquellos correspondientes a la familia de plásmidos IncF, seguidos de los plásmidos de tipo ColE, IncX e IncI (Fig. 60). Aun así, se ha visto, que la prevalencia de cada familia de plásmidos varía según el microorganismo que lo porta, el ambiente en el que se encuentre y la región geográfica de aislamiento^{125,213} (Fig. 61). Otro factor que puede alterar la frecuencia de cada uno de los plásmidos es su asociación con genes de resistencia. El motivo de esto es que el mayor interés actualmente, dadas sus complicaciones clínicas, en la detección y caracterización de plásmidos, es su implicación en infecciones por microorganismos multirresistentes. Es por esto, que la prevalencia real de algunos plásmidos podría quedar sesgada. Estas razones también podrían explicar la discrepancia entre el porcentaje de

replicones por cepa encontrado en nuestro estudio y el de Wyres *et al.*²¹² comentado anteriormente.

La publicación de Rozwandowicz *et al.*¹²⁵ recoge los datos de distintos estudios donde se describen genes de resistencia asociados a plásmidos de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* de países de distintos continentes y ambientes (Fig. 61). A pesar de que en nuestro estudio la detección de plásmidos se llevó a cabo independientemente de su asociación con genes de resistencia, si comparamos nuestros resultados en las siguientes figuras (Fig. 60 con los de la Fig. 61), se puede observar cómo los plásmidos IncF y los plásmidos IncI, en menor medida, siguen siendo dos de las familias plasmídicas predominantes, independientemente de si presentan o no genes de resistencia asociados. Por otro lado, los plásmidos IncA/C e IncHI también se detectan frecuentemente asociados a genes de resistencia en bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*¹²⁵ (Fig.61), en cambio, en nuestro estudio, solo se identificaron en un 1,9% (7/359) del total de cepas (Fig. 60). Estos datos nos podrían indicar que su alta frecuencia de detección puede deberse a una estrecha relación con los genes de resistencia que portan y no por ser comunes en la microbiota comensal humana.

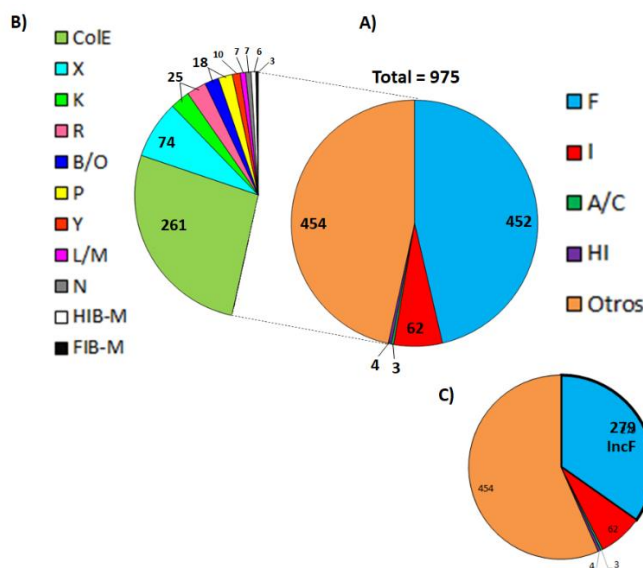


Figura 60. Replicones identificados en el total de cepas del estudio. A) Proporción de aquellos replicones más destacados por formar parte de plásmidos frecuentemente asociados a genes de

resistencia a antimicrobianos. B) Replicones en detalle de la fracción otros. C) Grafico con el número real de plásmidos IncF.

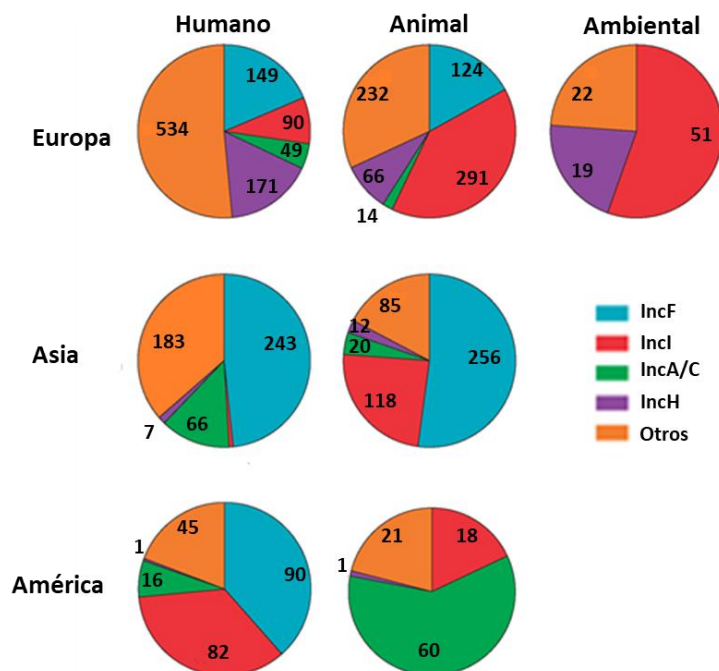


Figura 61. Distribución de diferentes tipos de plásmidos aislados de humanos, animales y del medio ambiente tanto en Europa, Asia como América. El grupo "otros" incluye: ColE, IncB / O, IncK, IncL / M, IncN, IncP, IncR, IncT, IncU, IncW, IncX, IncY e IncZ. Figura adaptada de Rozwandowicz *et al.* 2018¹²⁵.

Al comparar el contenido plasmídico de nuestras cepas de origen clínico y el de individuos sanos, observamos que, en general, el contenido de replicones de las cepas de *E. coli* sigue una tendencia similar en muestras de pacientes e individuos sanos. Es decir que, de los 21 replicones identificados en las cepas de *E. coli*, 16 de ellos estuvieron presentes en ambas poblaciones sin diferencias significativas. Sin embargo, los plásmidos IncL, IncM, IncA/C e IncN, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, sólo se detectaron en cepas clínicas. En otros estudios, estos cuatro plásmidos en concreto tampoco han sido detectados, o han sido detectados con frecuencias muy bajas, en cepas comensales de humanos^{131,214}, sin embargo, se

describen con frecuencia en cepas causantes de infección debido a su aportación de genes de resistencia^{73,135,143,215}. El hecho de detectar estos plásmidos solo en cepas causantes de infección de origen clínico y, además, sin una previa selección por resistencia antimicrobiana, hace plantearnos que el ambiente hospitalario, donde existe un alto uso de antimicrobianos y también una mayor probabilidad de transmisión interhumana, lo hacen un ambiente propicio para la selección de plásmidos con mayor adaptabilidad a estas características. Respecto a las cepas de *K. pneumoniae*, el contenido plasmídico de estas entre poblaciones parece seguir la misma tendencia que los plásmidos de las cepas de *E. coli*, pero esto no pudo confirmarse debido al bajo número de cepas obtenidas de muestras fecales, factor que nos limitó a la hora de establecer diferencias entre ambas poblaciones. Aun así, se observó como las cepas de *E. coli* presentaban una mayor cantidad de plásmidos distintos que en las cepas de *K. pneumoniae*; de hecho, de los 24 plásmidos identificados en el total de nuestras cepas, solo 14 estuvieron presentes en ambas especies (21 en *E. coli*, 17 en *K. pneumoniae*).

6.5.1. Localización de genes BLEE, AmpC y carbapenemasas

Conocido el contenido plasmídico de nuestras cepas y las diferencias entre poblaciones y especies, determinamos cual era la localización de los genes *bla* estudiados, observando que el 73,2% se encontraban asociados a plásmidos. Los plásmidos IncF, IncA/C, IncL/M, IncI, IncHI2 e IncN han sido descritos como los plásmidos portadores de genes de resistencia más frecuentes dentro de la familia *Enterobacteriaceae*^{73,82,125,131,184}. En el presente estudio, la mayoría de los genes *bla* detectados en plásmidos (88,5%) en las cepas de *E. coli*, fueron localizados en plásmidos IncF (38,5%), IncI1 (38,5%) o plásmidos con ambos replicones (11,8%). Estos resultados son comparables con aquellos detectados por Matsumura *et al.*²⁰⁸, donde describen que el 100% de los genes BLEE y AmpC identificados en cepas aisladas de distintas muestras clínicas, fueron localizados en plásmidos IncF (75,9%), IncI1 (24%) o con ambos replicones (2,7%).

En *K. pneumoniae*, la mayoría de los genes *bla* (75%) se identificaron en plásmidos IncF (46,7%), IncR (20%) o con ambos replicones (13,3%). En la base de datos de nucleótidos del NCBI, se describen más de 306 secuencias completas de plásmidos identificadas en *K. pneumoniae*; donde el replicón identificado con mayor frecuencia es el FIIK (53%) y, el 75% de estos, en asociación con el replicón FIB²¹⁶. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de plásmidos anotados en la base de datos del NCBI se encuentran en asociación con genes de resistencia a antimicrobianos, la detección de la gran mayoría de genes *bla* de nuestro estudio en plásmidos IncF no es de extrañar. Además, se ha visto que la presencia de los replicones FIIK y R en un mismo plásmido se encuentra de forma frecuente en distintos países del mundo, por lo que se describe como un éxito evolutivo que ha permitido su amplia difusión²¹⁶.

Comparando entre la población sana y la clínica, se pudo observar cómo los genes *bla* de cepas de muestra fecal se encontraron asociados solo a plásmidos IncF e IncI1, en cambio, en las cepas de hemocultivo, a pesar de que estos dos plásmidos siguieron predominando, hubo genes *bla* asociados a una variedad más amplia de grupos Inc (IncM, IncN e IncK). De igual modo, en un estudio comparativo entre cepas de *E. coli* de portadores y causantes de bacteriemia, también identificaron los plásmidos IncF e IncI1 como los más frecuentes en ambas poblaciones, aunque, un 25% de los plásmidos en portadores correspondió a otros grupos Inc distintos¹⁹⁸. Esta diferencia es atribuible al mayor número de cepas productoras de BLEE en este estudio en comparación con el nuestro. Aun así, es de destacar, que los plásmidos IncN e IncM, además de detectarse sólo en cepas clínicas, resultaron ser portadores de genes BLEE o AmpC, factor que apoya la hipótesis de que hay ciertos plásmidos más adaptados a ambientes hospitalarios por su carácter resistente.

Las BLEE, AmpC y carbapenemasas detectadas en el presente estudio (CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-27, CTX-M-32, SHV-12, SHV-2, DHA-1, KPC-3) han sido reportadas en distintas familias plasmídicas de diferentes especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae*, además de en distintos países y fuentes de aislamiento (Tabla 22). Como se observa en la Tabla 22, los plásmidos IncF se han detectado, en asociación con todos los genes *bla* del estudio, en países de todos los continentes y

en cepas aisladas de una amplia variedad de fuentes, tales como humanos, aves tanto salvajes como de corral, ganado, diversos tipos de animales destinados al consumo humano además de animales domésticos como perros. Aun así, predomina su descripción en asociación con betalactamasas CTX-M, sobre todo con la CTX-M-15.

Algo similar sucede con los plásmidos IncI1, detectándose de forma frecuente en asociación con BLEE de tipo CTX-M y SHV, pero sobre todo con AmpC de tipo CMY-2 (Tabla 22). Años atrás, la CMY-2 solía identificarse con mayor frecuencia en plásmidos A/C e IncK²¹⁷, pero eventos de movilización mediados por secuencias de inserción (*ISEcp1* como la más común²¹⁸), hicieron que este gen acabara fijándose en un plásmido que, además de su alta prevalencia, presenta características como factores de virulencia, que facilitan y promueven su diseminación como es el caso de los plásmidos IncI1^{144,219}.

Además de los anteriores, otros plásmidos descritos en la literatura, también en asociación con alguno de los genes *bla* del presente estudio, son los IncL/M con el gen *bla*_{DHA-1} o *bla*_{CTX-M-15}, los IncK con *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{SHV-12} o *bla*_{CMY-2}, los IncN con *bla*_{DHA-1}, todos los *bla*_{CTX-M} y *bla*_{KPC-3} junto a los plásmidos IncF, y otros como IncHI2 y IncX3 descritos en la Tabla 22.

Respecto a la betalactamasa SHV-28, la cual se detectó en el presente estudio, pero no figura en la Tabla 22, existe cierto debate referente a si debe o no ser tratada como una BLEE. En algunos estudios, la SHV-28 no se ha asociado con la hidrólisis de cefalosporinas o monobactámicos a pesar de que, en otros, cepas con esta betalactamasa sí que mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a aztreonam²²⁰⁻²²⁴. En el presente estudio, se identificaron cinco cepas de *K. pneumoniae bla*_{SHV-28}. Dos de estas cepas también fueron portadoras de CTX-M-15. Las tres cepas *bla*_{SHV-28} restantes, presentaron perfiles de sensibilidad acordes a la expresión de BLEE por lo que, en el presente estudio se las ha contabilizado como tales.

Tabla 22. Familias de plásmidos que se han descrito asociadas con alguna de las AmpC, BLEE y carbapenemasas del presente estudio.

β -lactamasas	Replicones	Especies	País	Fuente	Referencia
CTX-M-15	FII, FIA, FIB	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. enterica</i>	Australia, Bolivia, Canadá, República Africana Central, Croacia, República Checa, Francia, Kuwait, India, Italia, Portugal, España, Suiza, Tunicia, Turquía, Perú, UK, China, Europa central	Humanos, Aves	73,225,226
	I1	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	Australia, Francia, UK, Europa central, Argelia	Humanos, Aves, carne de res, Perro	73,225,227,228
	A/C	<i>E. coli</i>	Francia	Humanos	73
	L/M	<i>E. coli</i>	Francia	Humanos	73
	N	<i>E. coli</i>	Francia	Humanos	73
	HI2		Italia	Perros	229
	F, I1, R^a	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos	230*
CTX-M-14	K	<i>E. coli</i>	Australia, Francia, España, UK, China	Ganado, humanos	73
	FII, FIB	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>	Australia, Francia, China, Corea	Humanos, animales de consumo	73,231,232
	I1	<i>E. coli</i>	Australia, Bolivia, Francia, Perú, España, UK, Uruguay, China, Corea	Humanos, ganado	73,232,233
	HI2	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	España, China	Humanos, animales de consumo	73,231,234

	A/C	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	Francia, China	Humanos, animales de consumo	73,234
	N	<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	China	Humanos, animales de consumo	231,234
	F, I1, K	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos	230*
CTX-M-27	P	<i>S. enterica</i>	China	Animales de consumo	234
	A/C	<i>S. enterica</i>	China	Animales de consumo	234
	FIB, FII, FIA	<i>S. enterica</i> , <i>E. coli</i>	China, Australia, Japón, Europa central	Animales de consumo, Humanos, Aves	73,225,234,235
	N	<i>S. enterica</i>	China	Animales de consumo	234
	HI2	<i>S. enterica</i>	China	Animales de consumo	234
	F	<i>E. coli</i>	España	Humanos	230*
CTX-M-32	N	<i>E. coli</i>	España, Portugal, Corea	Humanos, cerdos, ganado	73,236
	N+F	<i>E. coli</i>	Portugal, Corea	Cerdos, ganado	232,236
	I1	<i>E. coli</i>	España	Humanos	230*
SHV-12	I1	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Italia, España, Alemania	Humanos, aves de corral, Aves salvajes, pollo, perro	73,228,237
	K	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos, pollo, perro	73,237
	FII, FIB	<i>E. coli</i> ,	Australia, Francia, Italia, España	Humanos, perros	73,228,237

		<i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>S. marcescens</i>			
	A/C	<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i>	Australia, Francia, Italia	Humanos	73
	HI2	<i>E. coli</i>	España	Humanos	73
	FIK	<i>K. pneumoniae</i>	USA	Humanos	73
	X3	<i>E. coli</i>	Alemania	Aves de corral	237
	F, I1^b, N	<i>E. coli</i>	España	Humanos	230*
SHV-2	A/C	<i>E. coli</i>	Francia	Humano	73
	FII, FIB	<i>E. coli</i>	Francia	humano	73
	R	<i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos	230*
CMY-2	I1	<i>E. coli</i> , <i>S. entérica</i> , <i>P. mirabilis</i>	Italia, Canadá, Francia, Gambia, UK, USA, España, Portugal, Alemania	Perro, Humanos, caballos, cerdos, aves de corral, ganado	73,217,228,229,238,239
	A/C	<i>E. coli</i> , <i>S. entérica</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i>	Canadá, Francia, Honduras, Irak, Irlanda, UK, USA, España, Alemania	Humanos, ganado, cerdos, aves de corral	73,238,239
	FIA, FIB	<i>E. coli</i>	UK, España	Humanos	73,238
	K	<i>E. coli</i>	Alemania	Humanos, ganado, animales de consumo	239
	I1, F^c, K	<i>E. coli</i>	España	Humanos	230*
DHA-1	FII	<i>E. coli</i>	Italia	perro	229
	R	<i>K. pneumoniae</i> ,	Francia, Portugal	Humanos	217,240

	L/M	<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. variicola</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>E. coli</i>	Francia, España	Humanos	238,240
	HI2-FIB	<i>K. pneumoniae</i>	Francia	Humanos	240
	HI2	<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i>	Portugal, China	Humanos	217,241
	N	<i>E. coli</i>	España	Humanos	238
	M	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos	230*
KPC-3	F	<i>K. pneumoniae</i>	Israel, Italia	Humanos	143
	N	<i>K. pneumoniae</i>	USA	Humanos	143
	FIK	<i>K. pneumoniae</i>	Italia	Humanos	242
	FII	<i>E. coli</i>	España	Humanos	243
	FIK, ND	<i>K. pneumoniae</i>	España	Humanos	230*

En gris se muestran los grupos plasmídicos identificados en el presente estudio en asociación con cada una de las betalactamasas identificadas. *Publicación del presente estudio.

^a Uno de los plásmidos con replicón R de *K. pneumoniae* también presentaba un replicón FIK

^b El único plasmido-blaSHV-12 con replicón I1 también presentaba replicones FII y FIB

^c Los dos plásmidos IncF-blaCMY-2 también presentaban replicones I1

Los genes BLEE y AmpC asociados a IncF e IncI1 más frecuentes fueron *bla*_{CTX-M-15/14} y *bla*_{CMY-2}, tanto en las cepas de muestra fecal como clínicas. De hecho, estos plásmidos han sido descritos como los promotores de la diseminación de estas betalactamasas en múltiples entornos^{217,228,239,244–246} y, el hecho de que los plásmidos IncF e IncI1 se encuentren en la microbiota comensal de individuos sanos sin previo tratamiento antimicrobianos, podría indicar que su alta frecuencia en la microbiota comensal puede haber contribuido a facilitar la adquisición de genes de resistencia y su posterior diseminación en el ámbito hospitalario y a nivel mundial. Pero la cuestión es si todo ello es fruto del azar, es decir, si los genes de resistencia fueron adquiridos de forma aleatoria por diferentes plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad (dada su elevada frecuencia) y luego cada uno de ellos llegó al ámbito hospitalario, o si, por el contrario, algún plásmido en concreto dentro de estos grupos de incompatibilidad, es el que adquirió ventajas evolutivas, como genes de resistencia, y es el que ha logrado una mayor diseminación alcanzando el ámbito hospitalario.

6.5.2. Subtipificación plasmídica

Dado que los plásmidos IncI1 e IncF fueron de los más frecuentes tanto en cepas de muestra fecal como de hemocultivo, además de ser de los más descritos como potenciales vehículos de transmisión de genes de resistencia a betalactámicos, se procedió a su subtipificación para determinar la existencia de subtipos plasmídicos predominantes en una o ambas poblaciones responsables de la diseminación global. Además, también se subtipificaron los plásmidos IncN, descritos también como vehículos de diseminación de betalactamasas y curiosamente solo detectados en cepas procedentes de muestra clínica.

Plásmidos IncI1

La subtipificación de los plásmidos IncI1 reveló una gran diversidad de ST tanto en cepas de *E. coli* de procedencia fecal como clínica. De hecho, de los 29 ST identificados, el 59% fueron asignados como ST nuevos en el presente estudio;

específicamente, el 50% de los ST detectados en cepas de individuos sanos y el 60% en las cepas de pacientes resultaron de nueva asignación. Algunos de los ST de plásmidos Incl1 más descritos a nivel mundial en enterobacterias son el ST2, ST12, ST26 y el ST36¹²⁸. Estos ST representaron el 22,5% del total de plásmidos Incl1 detectados en las cepas de *E. coli* de nuestro estudio. Los ST12 y ST36 fueron los únicos plásmidos Incl1 identificados en ambas poblaciones de *E. coli*, mientras que los ST2 y ST26 solo fueron identificados en cepas de *E. coli* de individuos sanos. Otros ST descritos frecuentemente a nivel mundial como el ST3, ST7, ST10, ST16, ST31 y el ST37¹²⁸, no se identificaron en ninguna de las cepas en estudio. El hecho de que más de la mitad de los ST identificados en las cepas clínicas (60%) fueran de nueva asignación, es decir, identificados por primera vez en el presente estudio, y que, por el contrario, solo dos de los ST más descritos a nivel mundial (ST12 y ST36) se encontraran presentes en estas cepas, sugiere que, estos últimos, han sido sobrestimados debido a su participación en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos. Por lo tanto, estamos hablando de un sesgo epidemiológico de los plásmidos Incl1 en general, por focalizarse principalmente en aquellos plásmidos Incl1 portadores de genes de resistencia.

A pesar de que el gen *bla*_{CMY-2} ha sido identificado en asociación con más de 77 ST Incl1 diferentes, los Incl1-*bla*_{CMY-2} descritos con mayor frecuencia son, principalmente, Incl1 ST2 y ST12^{128,144,247}.

En el presente estudio, este gen se encontró presente en siete plásmidos Incl1 en los cuales se observaron cinco ST distintos. De estos siete plásmidos, tres fueron identificados como ST12. Por lo tanto, todos los Incl1 ST12 del presente estudio resultaron ser portadores del gen *bla*_{CMY-2} y, estuvieron presentes tanto en las cepas de *E. coli* de individuos sanos como de pacientes. Estos resultados respaldan la hipótesis de que algunos plásmidos Incl1 han podido evolucionar y persistir en entornos de presión selectiva como el ámbito hospitalario, gracias a características particulares que les proporcionan resistencia, persistencia y éxito adaptativo, lo que explicaría por qué se reportan con mayor frecuencia y han sido descritos como plásmidos epidémicos^{128,247}. Además, el hecho de encontrarse también de forma

común en la microbiota comensal de individuos sanos portando estos genes de resistencia, tanto de humanos como vemos en este proyecto, como de animales^{248,249}, los convierte en un potencial reservorio para su transmisión y diseminación.

En *K. pneumoniae*, la frecuencia de plásmidos IncI1 es inferior que en *E. coli*, del mismo modo que se observa en la base de datos del pMLST (<https://pubmlst.org/plasmid/>) donde, el 70% de los plásmidos IncI1 se reportan en *E. coli* y solo un el 1% en *K. pneumoniae*. Además, la búsqueda en PubMed NCBI de “IncI1 y *K. pneumoniae*” solo muestra 32 resultados donde, en algunos, también hablan de *E. coli* y es donde detectan estos IncI1. Solo 10 plásmidos IncI1 fueron detectados en el presente estudio y, el 90% fue en cepas de *K. pneumoniae* clínicas, todos ellos de nueva asignación. En cambio, el ST26, uno de los más frecuentes comentado anteriormente, fue identificado en la única cepa de *K. pneumoniae* fecal con plásmido IncI1. Por lo tanto, tenemos que, los plásmidos IncI1 en *K. pneumoniae* son infrecuentes, pero, por el contrario, uno de los ST más frecuentes en *E. coli* se encontró en una cepa de *K. pneumoniae* fecal, sugiriendo que existe una estrecha relación entre las cepas comensales del microbioma intestinal, permitiendo la transferencia de plásmidos comunes en una especie, a otra que no lo es.

De estos 10 plásmidos identificados, el 50% de los ST no pudo ser determinado debido a la ausencia de producto amplificado de alguno de los genes requeridos para su subtipificación o bien, por la presencia de heterodúplex. Esto último podría deberse a la presencia de más de un replicón de este tipo. Como se ha descrito ya en diversos estudios y como hemos podido comprobar en el presente trabajo, los plásmidos IncF pueden presentar más de un replicón y no solo de tipo F. Se han encontrado de forma común plásmidos IncF con replicones N, R e I entre otros^{125,127,208,250} que, aunque no fueran funcionales en ese plásmido en concreto, podrían interferir en la lectura de la secuencia de otro plásmido IncI1 presente en esa misma célula. Tanto la ausencia de amplificado como la presencia de heterodúplex, también sucedió en las cepas de *E. coli*, pero en ningún caso se atribuye a un gen en concreto. Estos fenómenos también sucedieron en la

suptipificación de plásmidos IncN y la presencia de heterodúplex también sucedió en la subtipificación de los F.

Plásmidos IncF

Referente a la caracterización de los plásmidos IncF, el RST también reveló una gran diversidad de fórmulas FAB en ambas poblaciones de *E. coli* en estudio, encontrando 85 formulas FAB diferentes de un total de 205 plásmidos IncF. A diferencia de los plásmidos IncI1, donde se observó una clara diferenciación entre los ST de plásmidos detectados en las cepas de muestra fecal y clínica, en el caso de plásmidos IncF se identificaron un mayor número de fórmulas FAB compartidas entre ambas poblaciones. Además, la gran mayoría de estas fórmulas compartidas entre la población fecal y clínica, coincidieron con aquellas fórmulas más frecuentes del estudio. Algunas de estas fórmulas más frecuentes en ambas poblaciones como la F18:A-B1, F29:A-B10, F2:A-B1, F2:A-B-, F24:A-B1 o la F29:A-B10 han sido identificadas previamente en distintos ambientes tales como, en cepas de *E. coli* patogénicas, algunas de ellas multirresistentes, en aves y cerdos, entre otros animales de producción alimenticia, en cepas causantes de infección urinaria y bacteriemias en humanos. Además, la formula F2:A-B- se ha detectado en otras bacterias multirresistentes como *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *S. enterica* Typhimurium, *S. enterica* Paratyphi B entre otras enterobacterias^{126,251-253}, demostrando así la amplia distribución de estos plásmidos.

La cuestión es, si alguno de estos plásmidos IncF con RST definido podría ser el causante de la amplia diseminación de genes tales como *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-14}²⁵⁴⁻²⁵⁷ o *bla*_{CMY-2}²⁵⁷, entre otros.

Existe cierta controversia entre la existencia o no de plásmidos IncF epidémicos. Diversos estudios sugieren que plásmidos IncF tales como el F2:A1:B-, F1:A2:B20, F2:A-B- y el F31:A4:B1 se han convertido en plásmidos epidémicos responsables de la difusión de los genes *bla*_{CTX-M} y que, además, presentan una estrecha relación evolutiva con ciertos secuenciotipos de *E. coli* como el ST131^{244,258-260}. Estas cuatro fórmulas FAB fueron identificadas en nuestro estudio dentro del grupo de fórmulas

más frecuentes. Las fórmulas F2:A1:B- y F2:A-B- se detectaron en ambas poblaciones de *E. coli* y esta última también en cepas de *K. pneumoniae* de muestra fecal. Por otro lado, F1:A2:B20 y F31:A4:B1 solo se encontraron en cepas de *E. coli* clínicas. A pesar de su alta frecuencia y su detección tanto en ambas poblaciones como solo en clínica, el 6% (2/33) de estos plásmidos resultó ser portador de genes *bla*_{BLEE/AmpC}, y ambos con fórmula F2:A:B- (*bla*_{CTX-M-15} en *E. coli* clínica y *bla*_{CTX-M-27} en fecal). Los IncF resultaron los principales plásmidos asociados a BLEE (73%) pero, aun así, no hubo ninguna fórmula FAB destacable por ello, sino que, en general, eran todas distintas. De este modo, de acuerdo con nuestros resultados y los de estudios previos^{246,257}, no existe evidencia del predominio de un único plásmido IncF responsable de la diseminación de estos genes, por lo tanto, su difusión no depende de un único plásmido epidémico. Los plásmidos IncF son plásmidos muy versátiles con una gran capacidad de adaptación, además, ya se encontraban ampliamente distribuidos en la familia *Enterobacteriaceae*, incluso antes del uso de los antimicrobianos^{126,246}. Si juntamos sus características de adaptabilidad, persistencia y alta frecuencia, la probabilidad de que un gen de resistencia antimicrobiana, por azar, se asocie a estos plásmidos es más alta que en otros. Además, a pesar de que los genes que codifican para BLEE han llegado a un amplio rango de plásmidos distintos, parece que la exitosa diseminación del gen *bla*_{CTX-M-15} en concreto, se encuentra favorecida por la presencia del transposón Tn2-*bla*_{TEM-1} con origen en plásmidos IncF^{257,261}.

Plásmidos IncN

Por último, se subtipificaron los plásmidos IncN. En este caso, al ser solo cuatro plásmidos en *E. coli* y tres en *K. pneumoniae*, el ST de estos no aportó información significativa. Aun así, al solo identificarse en cepas clínica, se quisieron subtipificar para ver si existía algún ST destacable y/o predominante.

De los tres plásmidos tipificables detectados en *E. coli*, todos obtuvieron un ST distinto y, solo uno, el ST1 fue portador de una BLEE de tipo SHV-12. El ST1 es uno de los plásmidos IncN más descritos tanto en cepas de *E. coli* de humanos como en

todo tipo de animales y del medio ambiente; además, es considerado como el secuenciotipo causante de la diseminación de la betalactamasa CTX-M-1^{145,236,262}, viéndose asociada a la mayoría de los plásmidos IncN ST1 descritos, tal y como se muestra en la base de datos del pMLST. La BLEE CTX-M-32 también se ha descrito en asociación con el ST1, pero dado que se trata de una betalactamasa la cual solo difiere por el cambio de un nucleótido en la posición 785 de la CTX-M-1, es probable que posterior a la diseminación del plásmido Inc11 ST1-*bla*_{CTX-M-1}, debido a una mutación puntual, el gen *bla*_{CTX-M-1} haya evolucionado a *bla*_{CTX-M-32}²³⁶.

Referente a los plásmidos IncN en *K. pneumoniae*, se obtuvieron dos ST9 y un ST21 (nueva asignación). Son pocos los ST descritos en la base de datos del pMLST. Como se vió en resultados, se observa un predominio del ST11 en asociación con una VIM-1 pero, hasta el momento, esto se ha descrito solo en Grecia. Por otro lado, solo hay tres plásmidos anotados portadores del gen *bla*_{KPC-2}, mientras que hay diversos estudios al respecto de distintos países, que describen el ST15 como plásmido más frecuente asociado a esta carbapenemasa^{263,264}; por este motivo, sería aconsejable una actualización de la base de datos.

6.6. Estudio de otras características en las cepas de *E. coli*

Otro punto de estudio en este proyecto fue el de conocer los grupos filogenéticos de ambas poblaciones de *E. coli* y la presencia de factores de virulencia con el fin de determinar si existía alguna relación entre estos factores y el contenido plasmídico de las cepas.

Actualmente, son ocho los grupos filogenéticos reconocidos dentro de la especie *E. coli*: siete de ellos, que son el A, B1, B2, C, D, E y F, pertenecen a *E. coli* en sentido estricto y un octavo grupo que pertenece a distintos clados crípticos de *Escherichia*²¹. Este proceso de diferenciación por grupos filogenéticos se elaboró mediante la selección de distintos genes conservados (*house keeping genes*) que, según su combinación en cada cepa de *E. coli*, define el grupo filogenético al cual pertenecen.

E. coli es una especie bacteriana muy versátil, puede comportarse tanto como mutualista, comensalita, patógeno oportunista o hasta especializado²². Lo que se observó en su momento fue que, según el grupo filogenético al que pertenecían estas cepas, estas eran más o menos propensas a causar una infección^{265,266}. También se ha visto, que la prevalencia de grupos filogenéticos de *E. coli* comensales varía entre estudios^{22,214,267-269}. Mientras que el grupo filogenético B2 resultó ser el mayoritario en nuestro estudio con el 51% de cepas, otros autores describen el A y B1 como predominantes en la población de *E. coli* comensal humana seguido con frecuencias inferiores por B2 o D²⁶⁸ y otros, han determinado que los grupos filogenéticos más frecuentes son el A y el D, seguidos del B2 y B1²⁴. Se ha descrito que el motivo de esta variación es que la estructura genética de las cepas de *E. coli* comensales se encuentra condicionada por la gran diversidad de hospedadores y factores ambientales, y los determinantes involucrados en la virulencia y en la presión antibiótica, pueden modificar la prevalencia para una mejor adaptación a los hábitats comensales²². En la población clínica, el grupo filogenético B2 también fue el mayoritario y, en ambas poblaciones, este grupo de cepas resultó tener la mayor tasa de factores de virulencia. Este resultado no fue de extrañar dado que numerosos estudios han demostrado que el grupo B2 tiene una mayor prevalencia de determinantes de virulencia extraintestinal que las cepas de los demás grupos, además de ser los principales responsables de infecciones extraintestinales^{266,267}. Por otro lado, a pesar de que hasta el momento no se ha descrito ninguna asociación evidente entre el grupo filogenético de la cepa y su contenido plasmídico²⁵⁷, nuestros resultados indicaron una posible asociación entre los plásmidos IncHI1 y el grupo A ($P \leq 0,007$, corrección de Bonferroni aplicada); de hecho, todos los plásmidos de este grupo Inc se detectaron en cepas con grupo filogenético A.

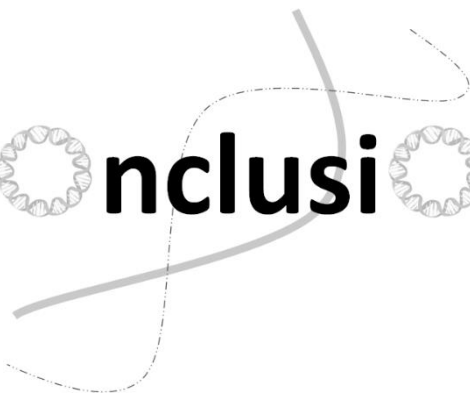
Se han descrito multitud de factores de virulencia que de forma individual o en combinación pueden proporcionar ciertas ventajas de adaptación a las cepas de *E. coli* que los portan, pero, por el contrario, en muchas ocasiones, esta adaptación de las cepas virulentas a nuevos ambientes tiene como consecuencia la generación, en el hospedador, de una patología. Algunos de estos factores pueden ser: factores de

adherencia, que les permiten colonizar sitios en los que *E. coli* normalmente no habita; toxinas, que afectan a una gran variedad de procesos eucarióticos fundamentales; factores de evasión del sistema inmunitario; y sideróforos y quelantes del hierro, los cuales privan al hospedador de este elemento^{17,270,271}. Tal y como esperábamos, a pesar de que todos los factores de virulencia tuvieron más o menos representación en todas las cepas de *E. coli* de ambas poblaciones, sana y clínica, su frecuencia fue superior, y de forma significativa, en las cepas clínicas, tal y como se describe en otros estudios¹⁶. Además, tal y como se ha comentado anteriormente, dentro de los distintos grupos filogenéticos, el B2 resultó ser el de mayor carga de estos factores. A pesar de no localizar estos genes de forma empírica, usando la técnica de *Southern blot*, se observó una relación significativa entre algunos de los factores (*fyuA*, *iutA*, *ompT*, *hlyF*, *usp* and *traT*) y las cepas hospedadoras de plásmidos IncF ($P \leq 0,003$, corrección de Bonferroni aplicada). Ya ha sido descrito, que los plásmidos IncF son capaces de portar con ellos una gran batería de determinantes de virulencia, hecho que, probablemente, sea uno de los factores responsables de su gran adaptabilidad y amplia diseminación^{73,272}. De hecho, genes como *traT* codifican para proteínas implicadas en el fenómeno de exclusión por superficie, en el cual, una célula con este plásmido se convierte en una mala receptora en posteriores conjugaciones. Esta proteína, además de su principal función, también ha sido identificada como la responsable de la resistencia sérica y la disminución de la sensibilidad de *E. coli* a ser fagocitada por macrófagos²⁷³.

En resumen, en el presente estudio se proporciona nueva información sobre los antecedentes de los plásmidos en cepas aisladas en un entorno no hospitalario, como es la microbiota comensal de individuos sanos. Aunque se observó una tendencia similar de los grupos de incompatibilidad identificados en ambas poblaciones, los plásmidos IncL, IncM, A/C e IncN, plásmidos descritos de forma frecuente por su papel en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos, sólo se detectaron en cepas clínicas. Este resultado refuerza la hipótesis de que, los centros clínicos y hospitalarios proporcionan un ambiente propicio para la selección de plásmidos con mayor adaptabilidad a las características del lugar.

Además, gracias a la subtipificación, se han podido observar dos rutas evolutivas seguidas por los plásmidos IncI1 e IncF: mientras que ciertos plásmidos IncI1 específicos, como IncI1 ST12, parecen haber sido seleccionados al adquirir características de persistencia, adaptación y resistencia a los antibióticos relevantes, hasta al punto de ser considerados plásmidos epidémicos, los plásmidos IncF parecen haber adquirido genes de resistencia a antimicrobianos de forma completamente aleatoria, sin ningún RST destacable. Por último, los resultados de este estudio confirman que las cepas de individuos sanos tienen menos resistencia a los antimicrobianos (aún y que la tendencia parece ir al alza) y menos factores de virulencia, además de mostrar una mayor diversidad de linajes filogenéticos que las cepas que causan infección.

7. nclusines



1. El porcentaje de cepas multirresistentes (MDR) detectado en individuos sanos (10,8%), aunque fue muy inferior al detectado en cepas clínicas (29,2%), no deja de ser alarmante debido a que, la microbiota comensal puede actuar como reservorio de bacterias multirresistentes o de los genes de resistencia a antimicrobianos.
2. La multirresistencia detectada en las cepas en estudio está asociada, principalmente, a la producción de BLEE, AmpC o carbapenemasas (76,5% de cepas MDR en individuos sanos y 61% en pacientes con bacteriemia). La gran mayoría de cepas productoras de estas enzimas (85,7%), presentan resistencia a uno o más fármacos de la familia de las quinolonas, aminoglucósidos y/o sulfamidas (cotrimoxazol).
3. La prevalencia de portadores sanos de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y AmpC fue de 7,3% (4,7% BLEE y 2,7% AmpC), detectando una tasa de incremento promedio de portadores de cepas de *E. coli* productoras de BLEE del 0,1% anual, del 2002 al 2014, en el área de Barcelona.
4. La prevalencia de carbapenemasas en cepas de *E. coli* es prácticamente inexistente y, en *K. pneumoniae*, permanece con tasas relativamente bajas.
5. La betalactamasa de espectro extendido CTX-M-15 y la AmpC CMY-2, son las betalactamasas predominantes tanto en las cepas de portadores sanos como en las cepas clínicas.
6. La media de replicones (y por extensión, posiblemente de plásmidos) por cepa, es superior en *E. coli* que en *K. pneumoniae*. En ambas especies, el número de cepas con ningún o un replicón es mayor en individuos sanos que en pacientes y, el porcentaje se invierte cuanto más grande es el número de replicones.
7. El contenido plasmídico de las cepas de pacientes sigue una tendencia similar que el de las cepas de individuos sanos sin diferencias significativas relevantes. Los replicones más frecuentes en las cepas de *E. coli* de ambas poblaciones son, ColE, FII, FIB, FIA, I1 y X1; y, en *K. pneumoniae*, ColE, FIIK, R e I1. Los plásmidos IncL, IncM, A/C e IncN de ambas especies en estudio, sólo (o en su gran mayoría), se encuentran presentes en cepas clínicas. De estos plásmidos, los

IncM e IncN, se identificaron con genes codificantes de BLEE. Estos dos factores sugieren una mayor adaptación de estos plásmidos a ámbitos clínicos.

8. La mayoría de los genes *bla* identificados (73,2%) en ambas especies y poblaciones se localizan en plásmidos; principalmente en plásmidos IncF e IncI1 en las cepas de *E. coli*, e IncFIIK e IncR en las cepas de *K. pneumoniae*.
9. A pesar de que factores tales como, área geográfica, la especie bacteriana, el origen y las condiciones del ambiente de aislamiento pueden influir en la frecuencia de cada uno de los distintos tipos de plásmidos, los plásmidos IncI1 e IncF siguen siendo los más prevalentes y difundidos a nivel mundial independientemente de su asociación a genes de resistencia a antimicrobianos.
10. Existe una gran diversidad de secuenciotipos de plásmidos IncI1, encontrando más de un 50% de ST de nueva asignación y una clara diferenciación entre los ST IncI1 de cepas de *E. coli* de individuos sanos y los de *E. coli* y *K. pneumoniae* de pacientes.
11. Se ha identificado el plásmido IncI1 ST12, descrito como epidémico, en tres cepas de *E. coli*, dos en individuos sanos y una en paciente, y en todos los casos en asociación con el gen *bla*_{CMY-2}. Esto apoya la idea de la existencia de ciertos ST epidémicos de plásmidos IncI1.
12. Existe una gran diversidad de fórmulas FAB (IncF) pero no hay diferenciación entre poblaciones. La mayoría de fórmulas FAB más frecuentes se detectan en ambas poblaciones.
13. No existe evidencia del predominio de un único plásmido IncF responsable de la diseminación de genes de resistencia tales como *bla*_{CTX-M-15} o *bla*_{CMY-2}.
14. Las cepas de individuos sanos tienen menos resistencia a los antimicrobianos y menos factores de virulencia, además de mostrar una mayor diversidad de linajes filogenéticos, que las cepas que causan infección.

7. CONCLUSIONS

1. The percentage of multidrug resistant (MDR) strains detected in healthy individuals (10.8%), although it was much lower than that detected in clinical strains (29.2%), is still alarming because the commensal microbiota can act as a reservoir of multi-resistant bacteria or antimicrobial resistance genes.
2. The multi-resistance detected in the strains from the study is mainly associated with the production of ESBL, AmpC or carbapenemases (76.5% of MDR strains in healthy individuals and 61% in patients with bacteremia). Most of the strains that produce these enzymes (85.7%) are resistant to one or more drugs from the quinolone, aminoglycosides family and / or sulfamethoxazole drugs
3. The prevalence of healthy carriers of ESBL- and AmpC-producing *E. coli* strains was 7.3% (4.7% ESBL and 2.7% AmpC). From 2002 to 2014, in the area of Barcelona, the average growth rate detected of carriers of ESBL-producing *E. coli* strains was 0.1% per year.
4. The prevalence of carbapenemases-producing *E. coli* strains is almost non-existent. In *K. pneumoniae*, it remains at relatively low rates.
5. The broad-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and the AmpC CMY-2 are the predominant beta-lactamases found in both healthy carrier and in clinical strains.
6. The average of replicons (and probably plasmids) per strain is higher in *E. coli* than in *K. pneumoniae*. In both species, the number of strains with one or without replicons is higher in healthy individuals than in patients. Nevertheless, the higher the number of replicons, the more those percentages get inverted.
7. The plasmid content of the clinical strains follows a similar trend as those of healthy individuals without significant differences. The most frequent replicons in the *E. coli* strains of both populations are ColE, FII, FIB, FIA, I1 and X1. In *K. pneumoniae*, ColE, FIIK, R and I1 are the most frequent replicons. The IncL, IncM, A/C and IncN plasmids of both species under study are only (or mostly) present

in clinical strains. Of these plasmids, IncM and IncN were identified with genes encoding ESBL. These two factors suggest a greater adaptation of these plasmids to clinical environments.

8. Most of the *bla* genes identified (73.2%) in both species and populations are localised in plasmids (mainly in IncF and IncI1 plasmids in *E. coli* strains, and IncFIIK and IncR in *K. pneumoniae* strains).
9. Although factors such as, geographic area, bacterial species, origin and conditions of the isolation environment can influence the frequency of each type of plasmids, the IncI1 and IncF plasmids remain the most prevalent and widespread worldwide, regardless of their association with antimicrobial resistance genes.
10. There is a broad diversity of IncI1 plasmid sequence types, finding more than 50% of newly assigned STs and a clear differentiation between the IncI1 STs of *E. coli* strains from healthy individuals and those of *E. coli* and *K. pneumoniae* from clinical samples.
11. The IncI1 ST12 plasmid, described as epidemic, has been identified in three strains of *E. coli*, two in healthy individuals and one in a patient and, in all cases, in association with the *bla*_{CMY-2} gene. It supports the idea of ST IncI1 epidemic plasmids.
12. There is a great diversity of FAB formulas (IncF) but there is no differentiation between populations. Most of the most frequent FAB formulas are detected in both populations.
13. There is no evidence of the predominance of a single IncF plasmid responsible for the spread of resistance genes such as *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{CMY-2}.
14. Strains from healthy individuals have less resistance to antimicrobials and less virulence factors. In addition, they show a broader diversity of phylogenetic lineages than strains that cause infection.

8. REFERENCIAS

1. Alnajar, S. & Gupta, R. S. Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family *Enterobacteriaceae* and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infect. Genet. Evol.* **54**, 108–127 (2017).
2. Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. & Gupta, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morgane*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5575–5599 (2016).
3. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–16 (2010).
4. Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. *Brock Biología de los Microorganismos*. (Prentice Hall-Pearson Education, 2009).
5. Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A. & Vollmer, W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 123–136 (2012).
6. Barreteau, H. *et al.* Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 168–207 (2008).
7. Vollmer, W. & Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1714–1734 (2008).
8. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (2017). Available at: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
9. Baron, S. *Medical Microbiology*. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996).
10. Price, L. B., Hungate, B. A., Koch, B. J., Davis, G. S. & Liu, C. M. Colonizing opportunistic pathogens (COPs): The beasts in all of us. *PLoS Pathog.* **13**, 1–8 (2017).
11. Martin, R. M. & Bachman, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–15 (2018).
12. Khanna, A., Khanna, M. & Aggarwal, A. *Serratia marcescens*- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in

- hospitalized patients. *J. Clin. Diagnostic Res.* **7**, 243–246 (2013).
13. Liu, H., Zhu, J., Hu, Q. & Rao, X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *Int. J. Infect. Dis.* **50**, 10–17 (2016).
 14. Rózalski, A. *et al.* *Proteus* sp. – an opportunistic bacterial pathogen – classification, swarming growth, clinical significance and virulence factors. *Folia Biol. Oecologica* **8**, 1–17 (2012).
 15. Puerta-García, A. & Mateos-Rodríguez, F. Enterobacterias. *Medicine (Baltimore)*. **10**, 3426–3431 (2010).
 16. Russo, T. A. & Johnson, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**, 1753–1754 (2000).
 17. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004).
 18. Sarowska, J. *et al.* Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog.* **11**, 1–16 (2019).
 19. Lee, S. *et al.* Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with bla CTX-M. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **40**, 361–367 (2010).
 20. Chaudhuri, R. R. & Henderson, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 214–226 (2012).
 21. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. & Gordon, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited : improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiol. Reports* **5**, 58–65 (2013).
 22. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 207–217 (2010).
 23. Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S. & Hall, R. M. Distribution of human commensal *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3455–3456 (2010).
 24. Stoppe, N. de C. *et al.* Worldwide phylogenetic group patterns of *Escherichia coli* from commensal human and wastewater treatment plant isolates. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
 25. Paczosa, M. K. & Meccasab, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
 26. Vading, M., Naucclér, P., Kalin, M. & Giske, C. G. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity

- and associated with high long-term mortality. *PLoS One* **13**, 1–13 (2018).
27. Chung, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, 1–6 (2016).
 28. Bengoechea, J. A. & Sa Pessoa, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 123–144 (2018).
 29. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**, 775–781 (2000).
 30. Wright, G. D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* **8**, (2010).
 31. Abebe, E., Tegegne, B. & Tibebe, S. A Review on Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics. *Eur. J. Appl. Sci.* **8**, 301–310 (2016).
 32. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**, 1037–50 (2007).
 33. Navarro, F., Miró, E. & Mirelis, B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **28**, 638–645 (2010).
 34. Averhoff, B. & Friedrich, A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* **180**, 385–393 (2003).
 35. Organización Mundial de la Salud. Las 10 principales causas de defunción. (2018). Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
 36. Gould, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 572–575 (2016).
 37. Saga, T. & Yamaguchi, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Med. Assoc. J.* **52**, 103–108 (2009).
 38. Levine, D. P. Vancomycin : A History. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 5–12 (2006).
 39. Zaffiri, L., Gardner, J. & Toledo-Pereyra, L. H. History of antibiotics. from salvarsan to cephalosporins. *J. Investig. Surg.* **25**, 67–77 (2012).
 40. Abraham, E. & Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 837 (1940). doi:doi: 10.1038/146837a0
 41. Kirby, W. M. M. Properties of a Penicillin Inactivator Extracted From Penicillin-Resistant Staphylococci 1. *J. Clin. Invest.* **24**, 170–174 (1944).
 42. Drawz, S. M. & Bonomo, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 160–201 (2010).

43. Suárez, C. & Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **27**, 116–129 (2009).
44. Shi, C. *et al.* Approaches for the discovery of metallo- β -Lactamase inhibitors: a review. *Chem. Biol. Drug Des.* **94**, 1427–1440 (2019).
45. Bush, K. & Bradford, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a025247 (2016).
46. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual Epidemiological Report for 2017 (Antimicrobial Consumption). 16 (2017).
47. Saini, A. & Bansal, R. Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far. *Adv. Biol. Chem.* **2**, 323–334 (2012).
48. Gómez, J., García-Vázquez, E. & Hernández-Torres, A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quim.* **28**, 1–9 (2015).
49. Arnau de Bolós, J. M., Castells Cervelló, X., Rigau Comas, D. & Vallano Ferraz, A. Antibióticos betalactámicos (I). *Medicine (Baltimore)*. **8**, 3356–3368 (2002).
50. Bush, K. & Bradford, P. A. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 295–306 (2019).
51. Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D. H. & Mengin-Lecreulx, D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 208–233 (2008).
52. Ur Rahman, S. *et al.* The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res. Int.* 1–14 (2018). doi:10.1155/2018/9519718
53. De Pascale, G. & Wright, G. D. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: From mechanisms to solutions. *ChemBioChem* **11**, 1325–1334 (2010).
54. Frere, J.-M. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**, 385–395 (1995).
55. Agency, E. M. Reflection paper on the use of third and fourth generation cephalosporins in food producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. (2018). Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01075.x>.
56. Navarro, F. Acquisition and horizontal diffusion of beta-lactam resistance among clinically relevant microorganisms. *Int Microbiol* **9**, 79–81 (2006).
57. Gao, M., Glenn, A. E., Blacutt, A. A. & Gold, S. E. Fungal lactamases: Their occurrence and function. *Front. Microbiol.* **8**, 1–17 (2017).
58. Naas, T. *et al.* Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J.*

- Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 917–919 (2017).
59. Bush, K., Jacoby, G. A. & Medeiros, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211–1233 (1995).
 60. Ambler, R. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci* **289**, 321–331 (1980).
 61. Bush, K. & Jacoby, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 969–976 (2010).
 62. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 933–951 (2001).
 63. Bush, K. Past and Present Perspectives on beta-Lactamases Karen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, 1–20 (2018).
 64. Bevan, E. R., Jones, A. M. & Hawkey, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2145–2155 (2017).
 65. Cantón, R., González-Alba, J. M. & Galán, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front. Microbiol.* **3**, 1–19 (2012).
 66. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. Extended-Spectrum beta -Lactamases : a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657–686 (2005).
 67. D’Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L. & Rossolini, G. M. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 305–317 (2013).
 68. Naas, T., Poirel, L. & Nordmann, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 42–52 (2008).
 69. Jacoby, G. A. AmpC B-Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 161–182 (2009).
 70. Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E. & Rossolini, G. M. AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection* (2019). doi:10.1007/s15010-019-01291-9
 71. Honoré, N., Nicolas, M. H. & Cole, S. T. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**, 3709–3714 (1986).
 72. Jaurin, B., Grundström, T., Edlund, T. & Normark, S. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* **290**, 221–5 (1981).

73. Carattoli, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2227–2238 (2009).
74. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007).
75. Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1791–1798 (2011).
76. Bedenić, B., Plečko, V., Sardelić, S., Uzunović, S. & Godič Torkar, K. Carbapenemases in gram-negative bacteria: Laboratory detection and clinical significance. *Biomed Res. Int.* 1–3 (2014). doi:10.1155/2014/841951
77. Codjoe, F. & Donkor, E. Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* **6**, 1–28 (2018).
78. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732 (2005).
79. Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-hoang, B. A. O. & Chandler, M. Everyman 's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0030–2014 (2015).
80. Roberts, A. P., Chandler, M., Courvalin, P. & Guédon, G. Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements. *Plasmid* **60**, 1–12 (2008).
81. ESCUDERO, J. A., LOOT, C., NIVINA, A. & MAZEL, D. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0019–2014 (2018).
82. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, 1–61 (2018).
83. Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N. & van der Meer, J. R. The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 512–537 (2017).
84. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721 (2005).
85. Von Wintersdorff, C. J. H. *et al.* Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* **7**, 1–10 (2016).
86. Torres-Barceló, C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, 1–12 (2018).
87. Penadés, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N. & Novick, R. P. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.* **23**, 171–178 (2015).

88. Touchon, M., Moura de Sousa, J. A. & Rocha, E. P. Embracing the enemy: The diversification of microbial gene repertoires by phage-mediated horizontal gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **38**, 66–73 (2017).
89. Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A. & Goodridge, L. D. Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the *Enterobacteriaceae* family - A review. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13 (2017).
90. Ilangovan, A., Connery, S. & Waksman, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol.* **23**, 301–310 (2015).
91. Frank, A. C., Alsmark, C. M., Thollessen, M. & Andersson, S. G. E. Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1325–1336 (2005).
92. Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F. & Arechaga, I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 81–95 (2015).
93. Heap, J. T. *et al.* Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Res.* **40**, e59 (2012).
94. Shintani, M., Sanchez, Z. K. & Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
95. Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A. & De la Cruz, F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 936–956 (2011).
96. Norman, A., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* **364**, 2275–2289 (2009).
97. Paulsson, J. Multileveled selection on plasmid replication. *Genetics* **161**, 1373–1384 (2002).
98. Million-Weaver, S. & Camps, M. Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid* **0**, 27–36 (2014).
99. Guynet, C. & de la Cruz, F. Plasmid segregation without partition. *Mob. Genet. Elements* **1**, 236–241 (2011).
100. Bioscience, A. & Estates, A. Application for access to University electronic facilities Which box should I tick under “ Status ”? What happens next ?
101. Hao, Y. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of clinical *Escherichia coli* sequence type 405 carrying IncN2 plasmid harboring

- blaNDM-1. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
102. Surette, M. D. & Wright, G. D. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 309–329 (2017).
 103. Peterson, E. & Kaur, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
 104. Dolejska, M. & Papagiannitsis, C. C. Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid* **99**, 99–111 (2018).
 105. Martínez, J. L. Ecology and Evolution of Chromosomal Gene Transfer between Environmental Microorganisms and Pathogens. *Microbiol. Spectr.* **6**, 1–16 (2018).
 106. Lopatkin, A. J., Sysoeva, T. A. & You, L. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: Analysis suggests a critical role of selection dynamics. *BioEssays* **38**, 1283–1292 (2016).
 107. Wagner, S., Lupolova, N., Gally, D. L. & Argyle, S. A. Convergence of plasmid architectures drives emergence of multi-drug resistance in a clonally diverse *Escherichia coli* population from a veterinary clinical care setting. *Vet. Microbiol.* **211**, 6–14 (2017).
 108. Buckner, M. M. C. *et al.* Clinically Relevant Plasmid-Host Interactions Indicate that Transcriptional and Not Genomic Modifications Ameliorate Fitness Costs of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Carrying Plasmids. *MBio* **9**, 1–18 (2018).
 109. Escudero, J. A., MacLean, R. C. & San Millan, A. Testing the Role of Multicopy Plasmids in the Evolution of Antibiotic Resistance. *J. Vis. Exp.* e57386 (2018). doi:10.3791/57386
 110. San Millan, A., Escudero, J., Gifford, D., Mazel, D. & MacLean, R. Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 10 (2016).
 111. Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. & Maas, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**, 375–95 (1988).
 112. Orlek, A. *et al.* Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. *Plasmid* **91**, 42–52 (2017).
 113. Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V. & De La Cruz, F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 657–687 (2009).
 114. Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P. & de la Cruz, F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in

- clinical and environmental settings. *PLoS One* **7**, (2012).
115. Datta, N. & Hedges, R. Compatibility Groups among ϕ -R Factors. *Nature* **239**, 222–223 (1971).
 116. Novick, R. P. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–95 (1987).
 117. Thomas, C. M. Plasmid Incompatibility. *Mol. Life Sci.* 1–3 (2014). doi:10.1007/978-1-4614-6436-5
 118. Summers, D. *The Biology of plasmids.* (2009).
 119. Watanabe, T., Ogata, C., Arai, T., Sato, S. & Nishida, H. Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in *Enterobacteriaceae*. VII Two Types of Naturally Occurring R Factors. *J. Bacteriol.* **88**, 922–928 (1964).
 120. Gotz, A. *et al.* Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 23 (1996).
 121. Carattoli, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**, 219–228 (2005).
 122. Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F. & Rocha, E. P. C. The repertoire of *ice* in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
 123. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & de la Cruz, F. Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 434–452 (2010).
 124. Bertini, A. *et al.* Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4168–4177 (2010).
 125. Rozwandowicz, M. *et al.* Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1121–1137 (2018).
 126. Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D. & Carattoli, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2518–2529 (2010).
 127. Osborn, A. M., da Silva Tatley, F. M., Steyn, L. M., Pickup, R. W. & Saunders, J. R. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology* **146**, 2267–2275 (2000).
 128. Carattoli, A., Villa, L., Fortini, D. & García-Fernández, A. Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* (2018). doi:10.1016/j.plasmid.2018.12.001
 129. Szmolka, A. *et al.* First report on *incN* plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microb. Drug*

- Resist.* **17**, 567–573 (2011).
130. Yang, X. *et al.* F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of fosA3 and blaCTX-M-55/-14/-65 in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front. Microbiol.* **5**, 1–8 (2014).
 131. Johnson, T. J. *et al.* Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1976–1983 (2007).
 132. Moodley, A. & Guardabassi, L. Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1709–1711 (2009).
 133. Harmer, C. J. & Hall, R. M. The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* **80**, 63–82 (2015).
 134. Hancock, S. *et al.* Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, 1–17 (2017).
 135. Ambrose, S. J., Harmer, C. J. & Hall, R. M. Compatibility and entry exclusion of IncA and IncC plasmids revisited: IncA and IncC plasmids are compatible. *Plasmid* **96–97**, 7–12 (2018).
 136. Maher, D. & Taylor, D. Host range and transfer efficiency of incompatibility groupHI plasmids. *Can. J. Microbiol.* **39**, 581–7 (1993).
 137. Liang, Q. *et al.* Sequencing and comparative genomics analysis of the IncHI2 plasmids pT5282-mphA and p112298-catA and the IncHI5 plasmid pYNKP001-dfrA. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 709–718 (2017).
 138. Alvarez, S. Comparative genomics and phylogeny of sequenced IncHI plasmids. *bioRxiv* (2018). doi:10.1101/334409
 139. Sherburne, C. K. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2177–2186 (2000).
 140. Gilmour, M. W., Thomson, N. R., Sanders, M., Parkhill, J. & Taylor, D. E. 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 (2004).
 141. Phan, M. D. *et al.* Variation in *Salmonella enterica* serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 716–727 (2009).
 142. Carattoli, A. Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 654–658 (2011).
 143. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.*

- 303**, 298–304 (2013).
144. García-Fernández, A. *et al.* Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1229–1233 (2008).
 145. García-Fernández, A. *et al.* Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 1987–1991 (2011).
 146. García-Fernández, A. & Carattoli, A. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, A subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamase and quinolone resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1155–1161 (2010).
 147. Szczepanowski, R. *et al.* The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology* **151**, 1095–1111 (2005).
 148. Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F. & Mirelis, B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **29**, 524–534 (2011).
 149. Magiorakos, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012).
 150. Ishmael, F. T. & Stellato, C. Principles and applications of polymerase chain reaction: Basic science for the practicing physician. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **101**, 437–443 (2008).
 151. García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D. & Carattoli, A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 274–281 (2009).
 152. Johnson, T. J. *et al.* Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* **68**, 43–50 (2012).
 153. Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V. & Endimiani, A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
 154. Oteo, J. *et al.* Inhibitor-resistant TEM- And OXA-1-producing *Escherichia coli* isolates resistant to amoxicillin-clavulanate are more clonal and possess lower virulence gene content than susceptible clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3874–3881 (2014).

155. Schwartz, D. C. & Cantor, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67–75 (1984).
156. Herschleb, J., Ananiev, G. & Schwartz, D. C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat. Protoc.* **2**, 677–684 (2007).
157. Barton, B., Harding, G. & Zuccarelli, A. A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal. Biochem.* **226**, 235–240 (1995).
158. Liu, S. L., Hessel, A. & Sanderson, K. E. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6874–6878 (1993).
159. Southern, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by Gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503 (1975).
160. Southern, E. Southern blotting. *Nat. Protoc.* **1**, 518–525 (2006).
161. Zhou, Z. *et al.* Grapetree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* **28**, 1395–1404 (2018).
162. San Millan, A. & MacLean, R. C. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol. Spectr.* **5**, 1–12 (2017).
163. Carroll, A. C. & Wong, A. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can. J. Microbiol.* **64**, 293–304 (2018).
164. Banu, H. & Prasad, K. P. Role of Plasmids in Microbiology. *J. Aquac. Res. Dev.* **8**, 1–8 (2017).
165. Javadi, M., Bouzari, S. & Oloomi, M. Horizontal Gene Transfer and the Diversity of *Escherichia coli*. in *IntechOpen* 317–331 (2017).
166. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299–304 (2000).
167. Jain, R., Rivera, M. C., Moore, J. E. & Lake, J. A. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1598–1602 (2003).
168. Harrison, E. & Brockhurst, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol.* **20**, 262–267 (2012).
169. Klemm, E. J., Wong, V. K. & Dougan, G. Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 12872–12877 (2018).
170. Porse, A., Schønning, K., Munck, C. & Sommer, M. O. A. Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 2860–2873 (2016).

171. San Millan, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol.* **26**, 978–985 (2018).
172. Fariñas, M. C. & Martínez-Martínez, L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **31**, 402–409 (2013).
173. Schultsz, C. & Geerlings, S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*: Changing landscape and implications for therapy. *Drugs* **72**, 1–16 (2012).
174. Ramirez, M. S., Traglia, G. M., Lin, D. L., Tran, T. & Tolmasky, M. E. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol. Spectr.* **2**, 1–15 (2014).
175. Du, P., Zhang, Y. & Chen, C. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 23–24 (2017).
176. Woerther, P. L., Burdet, C., Chachaty, E. & Andremont, A. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 744–758 (2013).
177. Pormohammad, A., Nasiri, M. J. & Azimi, T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: A systematic review and meta-analysis. *Infect. Drug Resist.* **12**, 1181–1197 (2019).
178. Mulvey, M. R. & Simor, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Can. Med. Assoc. J.* **180**, 408–415 (2009).
179. Ben, Y. *et al.* Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environ. Res.* **169**, 483–493 (2019).
180. Sáenz, Y. *et al.* Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* **18**, 353–358 (2001).
181. Subbiah, M. *et al.* Antimicrobial resistant enteric bacteria are widely distributed amongst people, animals and the environment in Tanzania. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
182. Bourély, C. *et al.* Trends in antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from defined infections in humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1525–1529 (2020).
183. Szmolka, A. & Nagy, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front. Microbiol.* **4**, 1–13 (2013).
184. Madec, J. Y. & Haenni, M. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food

- and food-producing animals. *Plasmid* **99**, 72–81 (2018).
185. Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y. & Miller, R. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1394–1404 (2005).
 186. Gozi, K. S. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in feedlot lambs in southeastern Brazil. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
 187. Diekema, D. J. *et al.* The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 1–10 (2019).
 188. Singh, A. K. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among the children in rural hill communities of northeast India. *PLoS One* **13**, 1–15 (2018).
 189. Bok, E. *et al.* Comparison of commensal *Escherichia coli* isolates from adults and young children in Lubuskie province, Poland: Virulence potential, phylogeny and antimicrobial resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, 1–19 (2018).
 190. Cakir, N., Süer, K., Özçem, S., Güler, E. & Etikan, I. Phenotypic Characterization of Non-Beta Lactam Multidrug Resistance in Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producer and Non-Producer *Enterobacteriaceae*. *J. Infect. Dis. Treat.* **4**, 1–6 (2018).
 191. Thomson, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1019–1025 (2010).
 192. Farajzadehsheikh, A., Veisi, H., Shahin, M., Getso, M. & Farahani, A. Frequency of quinolone resistance genes among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Trop. Med. Health* **47**, 1–7 (2019).
 193. de Champs, C. *et al.* Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 441–457 (1991).
 194. Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B. & Poirel, L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 52–59 (2005).
 195. Mirelis, B. *et al.* Community Transmission of Extended-Spectrum β -Lactamase. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1024–1025 (2003).
 196. Miró, E. *et al.* Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.*

- 56, 1152–1155 (2005).
197. Diaz Agero, C. *et al.* Local prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* intestinal carriers at admission and co-expression of ESBL and OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*: A prevalence survey in a Spanish University Hospital. *BMJ Open* **9**, 1–6 (2019).
 198. Ny, S. *et al.* Community carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* is associated with strains of low pathogenicity: A Swedish nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 582–588 (2016).
 199. Ulstad, C. R. *et al.* Carriage of ESBL/AmpC-producing or ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in healthy people in Norway. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **5**, 1–11 (2016).
 200. Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C. & Mylonakis, E. Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and Risk Factors among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 310–318 (2016).
 201. Garrido, A. *et al.* Characterization of plasmid-mediated β -Lactamases in fecal colonizing patients in the hospital and community setting in Spain. *Microb. Drug Resist.* **20**, 301–304 (2014).
 202. Giani, T. *et al.* Evolving beta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Eurosurveillance* **22**, 30583 (2017).
 203. Sun, Y. *et al.* High prevalence of blaCTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 1475–1481 (2010).
 204. Liu, H. *et al.* Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from the rivers and lakes in Northwest China. *BMC Microbiol.* **18**, 1–12 (2018).
 205. Ben Sallem, R. *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**, 1137–1142 (2012).
 206. Baudry, P. J., Mataseje, L., Zhanel, G. G., Hoban, D. J. & Mulvey, M. R. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC β -lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **65**, 379–383 (2009).
 207. Naseer, U., Haldorsen, B., Simonsen, G. S. & Sundsfjord, A. Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 171–178 (2009).

208. Matsumura, Y. *et al.* Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 158–162 (2012).
209. Stoesser, N. *et al.* Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
210. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Outbreak of carbapenemase-producing (NDM-1 and OXA-48) and colistin-resistant Klebsiella pneumoniae ST307, north-east Germany.* (2019).
211. Duman, Y., Ersoy, Y., Gursoy, N. C., Toplu, S. A. & Otlu, B. A silent outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* that co-produced NDM-1 and OXA-48 carbapenemases, and infection control measures. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **23**, 46–50 (2019).
212. Wyres, K. L. & Holt, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 131–139 (2018).
213. Adenipekun, E. O. *et al.* Plasmid replicons and β -lactamase-encoding genes of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and food animals in Lagos, Southwest Nigeria. *Microb. Drug Resist.* **25**, 1410–1423 (2019).
214. Moran, R. A., Anantham, S., Pinyon, J. L. & Hall, R. M. Plasmids in antibiotic susceptible and antibiotic resistant commensal *Escherichia coli* from healthy Australian adults. *Plasmid* **80**, 24–31 (2015).
215. Argente, M. *et al.* Molecular characterization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains after a carbapenem resistance increase in Catalonia. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **37**, 82–88 (2019).
216. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K. & Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275 (2017).
217. Ribeiro, T. G. *et al.* Dynamics of clonal and plasmid backgrounds of *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC in Portuguese clinical settings over time. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 650–656 (2019).
218. Verdet, C. *et al.* Genetic context of plasmid-carried bla_{CMY-2}-like genes in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4002–4006 (2009).
219. Tagg, K. A., Iredell, J. R. & Partridge, S. R. Complete sequencing of IncI1 sequence type 2 plasmid pJIE512b indicates mobilization of bla_{CMY-2} from an IncA/C plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 4949–4952 (2014).
220. Mendonça, N., Ferreira, E. & Caniça, M. Occurrence of a novel SHV-type

- enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum β -lactamase-producing evaluation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **56**, 415–420 (2006).
221. Niumsup, P. R., Tansawai, U., Boonkerd, N., Polwichai, P. & Dejsirilert, S. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals. *J. Infect. Chemother.* **14**, 404–408 (2008).
 222. Schmiedel, J. *et al.* Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiol.* **14**, 1–13 (2014).
 223. Kim, Y. T., Kim, T. U. & Baik, H. S. Characterization of extended spectrum β -lactamase genotype TEM, SHV and CTX-M producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 889–895 (2006).
 224. Tofteland, S. *et al.* Effects of phenotype and genotype on methods for detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 199–205 (2007).
 225. Tausova, D. *et al.* *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in central europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1103–1107 (2012).
 226. Zhuo, C., Li, X. qiang, Zong, Z. yong & Zhong, N. S. Epidemic Plasmid Carrying blaCTX-M-15 in *Klebsiella penumoniae* in China. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).
 227. Rebbah, N. *et al.* Diversity of CTX-M extended-spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* isolates from retail raw ground beef: First report of CTX-M-24 and CTX-M-32 in Algeria. *Microb. Drug Resist.* **24**, 896–908 (2018).
 228. Dupouy, V. *et al.* Prevalence of beta-lactam and quinolone/fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from dogs in France and Spain—characterization of ESBL/pAmpC isolates, genes, and conjugative plasmids. *Front. Vet. Sci.* **6**, 279 (2019).
 229. Mattioni Marchetti, V. *et al.* Deadly Puppy Infection Caused by an MDR *Escherichia coli* O39 blaCTX-M-15, blaCMY-2, blaDHA-1, and aac(6)-Ib-cr – Positive in a Breeding Kennel in Central Italy. *Front. Microbiol.* **11**, 1–7 (2020).
 230. Rodríguez-Navarro, J. *et al.* Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Judith. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e02064-19 (2020).
 231. Liao, X. P. *et al.* Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Front. Microbiol.* **6**, 1–8 (2015).

232. Tamang, M. D. *et al.* Molecular characterization of CTX-M β -lactamase and associated addiction systems in *Escherichia coli* circulating among cattle, farm workers, and the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3898–3905 (2013).
233. Di Pilato, V. *et al.* Characterization of the first bla CTX-M-14 /ermB-carrying IncI1 plasmid from Latin America. *Plasmid* **102**, 1–5 (2019).
234. Zhang, W. H. *et al.* CTX-M-27 producing *Salmonella enterica* serotypes typhimurium and Indiana are prevalent among food-producing animals in China. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
235. Matsuo, N. *et al.* Characterization of blaCTX-M-27/F1:A2:B20 Plasmids Harbored by *Escherichia coli* Sequence Type 131 Sublineage C1/H30R Isolates Spreading among Elderly Japanese in Nonacute-Care Settings. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e00202-20 (2020).
236. Rodrigues, C., Machado, E., Peixe, L. & Novais, Â. IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2245–2248 (2013).
237. Alonso, N. *et al.* Molecular characterisation of acquired and overproduced chromosomal blaAmpC in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* **47**, 62–68 (2016).
238. Mata, C. *et al.* Plasmid typing and genetic context of AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal ampC genes: Findings from a Spanish hospital 1999–2007. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 115–122 (2012).
239. Pietsch, M. *et al.* Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics* **19**, 1–17 (2018).
240. Hennequin, C., Chlilek, A., Beyrouthy, R., Bonnet, R. & Robin, F. Diversity of DHA-1-encoding plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 16 French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 2981–2989 (2018).
241. Wang, S. *et al.* A Multidrug Resistance Plasmid pIMP26, Carrying blaIMP-26, fosA5, blaDHA-1, and qnrB4 in *Enterobacter cloacae*. *Sci. Rep.* **9**, 1–7 (2019).
242. Kocsis, E., Lo Cascio, G., Piccoli, M., Cornaglia, G. & Mazzariol, A. KPC-3 carbapenemase harbored in FIIk plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST512 and *Escherichia coli* ST43 in the same patient. *Microb. Drug Resist.* **20**, 377–382 (2014).
243. Porres-Osante, N. *et al.* Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1792–1795 (2014).

244. Irrgang, A. *et al.* CTX-M-15-producing *E. coli* isolates from food products in Germany are mainly associated with an IncF-type plasmid and belong to two predominant clonal *E. coli* lineages. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
245. Zhao, W. H. & Hu, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**, 79–101 (2013).
246. Robin, F. *et al.* Inventory of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in France as Assessed by a Multicenter Study. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01911-16 (2017).
247. Smith, H. *et al.* Characterization of Epidemic Inc11-ly Plasmids Harboring Ambler Class A and C Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from Animals and Humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5357–5365 (2015).
248. Castellanos, L. R., Bloois, L. V. D. G., Donado-godoy, P., Mevius, D. J. & Wagenaar, J. A. Phylogenomic Investigation of Inc11-ly Plasmids Harboring blaCMY-2 and blaSHV-12 in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Multiple Countries. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 1–6 (2019).
249. Accogli, M. *et al.* Inc11 plasmids associated with the spread of CMY-2, CTX-M-1 and SHV-12 in *Escherichia coli* of animal and human origin. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, 2–4 (2013).
250. Froehlich, B., Parkhill, J., Sanders, M., Quail, M. A. & Scott, J. R. The pCoo plasmid of enterotoxigenic *Escherichia coli* is a mosaic cointegrate. *J. Bacteriol.* **187**, 6509–6516 (2005).
251. Yang, Q. E. *et al.* IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
252. Xia, L. *et al.* Prevalence of ST1193 clone and Inc11/ST16 plasmid in *E. coli* isolates carrying blaCTX-M-55 gene from urinary tract infections patients in China. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
253. Matsumura, Y. *et al.* Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4736–4742 (2013).
254. Marcadé, G. *et al.* Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 67–71 (2009).
255. Novais, Â. *et al.* 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. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 796–799 (2007).

256. Ceccarelli, D. *et al.* Diversity of plasmids and genes encoding resistance to extended spectrum cephalosporins in commensal *Escherichia coli* From Dutch livestock in 2007-2017. *Front. Microbiol.* **10**, 1–9 (2019).
257. Branger, C. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microb. Genomics* **4**, (2018).
258. Mahéroult, A.-C. *et al.* Advantage of the F2:A1:B- IncF Pandemic Plasmid over IncC Plasmids in In Vitro Acquisition and Evolution of blaCTX-M Gene-Bearing Plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e01130-19 (2019).
259. Johnson, T. J. *et al.* Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H 30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *mSphere* **1**, e00121-16 (2016).
260. Kondratyeva, K., Salmon-Divon, M. & Navon-Venezia, S. Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci. Rep.* **10**, 1–11 (2020).
261. Partridge, S. R., Zong, Z. & Iredell, J. R. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying bla CTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4971–4978 (2011).
262. Dolejska, M., Villa, L., Hasman, H., Hansen, L. & Carattoli, A. Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 333–339 (2013).
263. Schweizer, C. *et al.* Plasmid-mediated transmission of KPC-2 carbapenemase in *Enterobacteriaceae* in critically ill patients. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
264. Chmelnitsky, I. *et al.* Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in *Enterobacteriaceae*-comparative genomics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**, 255–260 (2014).
265. Johnson, J. R. & Stell, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J. Infect. Dis.* **181**, 261–272 (2000).
266. Picard, B. *et al.* The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection? *Infect. Immun.* **67**, 546–553 (1999).
267. Escobar-Páramo, P. *et al.* Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5698–5700 (2004).
268. Duriez, P. *et al.* Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically

- distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**, 1671–1676 (2001).
269. Pallecchi, L. *et al.* Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1179–1184 (2007).
270. Mainil, J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **152**, 2–12 (2013).
271. Croxen, M. A. & Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010).
272. Pilla, G. & Tang, C. M. Going around in circles: Virulence plasmids in enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 484–495 (2018).
273. Garcillán-Barcia, M. P. & de la Cruz, F. Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**, 1–18 (2008).

9. ANEXOS

ANEXO I. Documento de aprobación del comité de ética y consentimiento informado para los voluntarios.



Sant Antoni Ma Claret, 167 · 08025 Barcelona
Tel. 93 291 90 00 · Fax 93 291 94 27
e-mail: santpau@santpau.cat
www.santpau.cat

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

TÍTULO: Implicación de plásmidos y bacteriófagos en la difusión de las resistencias a antimicrobianos en humanos. Epidemiología del plásmido.		
CÓDIGO: 12/065/1350	IP: Dr. F. Navarro	SERVICIO: MICROBIOLOGÍA

Doña **Milagros Alonso Martínez**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo,

CERTIFICA:

Que en su reunión de fecha 8 de Mayo 2012 este Comité ha analizado el proyecto de investigación de referencia y considera que se ajusta a las disposiciones vigentes.

Por ello, ha acordado informar favorablemente sobre su realización.

Y para que así conste, firma el presente en Barcelona, a 24 de Mayo de 2012.


Dra. Milagros Alonso

FUNDACIÓ DE GESTIÓ SANITÀRIA DE
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
COMITÈ ÈTIC D'INVESTIGACIÓ CLÍNICA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE

Título del estudio: Implicación de plásmidos y bacteriófagos en la difusión de las resistencias a antimicrobianos en humanos. Epidemiología del plásmido.

Código del estudio:

Investigador principal: Dr. Ferran Navarro, Servicio de Microbiología, Telf: 935537297

Centro: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un proyecto de investigación en el que se le invita a participar.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Debe saber que su participación es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con el personal sanitario.

Descripción general del proyecto

El objetivo de este proyecto es determinar la importancia de distintos vectores (plásmidos y bacteriófagos) en la difusión de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

Si usted decide participar se le solicitará un isopo rectal.

Se le solicitará su consentimiento para que con la muestra se realice un coprocultivo. Una vez completado el estudio su muestra se desechará, y no se recogerán más datos ni muestras.

Beneficios y riesgos derivados de su participación

Su participación en este proyecto carece de riesgos. Asimismo, debe saber que usted no obtendrá ningún beneficio de su participación en este proyecto; pero de los resultados del mismo podría derivarse un beneficio para la sociedad.

Confidencialidad

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso,

modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Le garantizamos que su intimidad será estrictamente respetada y que los resultados obtenidos de este procedimiento nunca irán acompañados de datos o informaciones que puedan revelar su identidad a terceros.

Compensación económica:

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto.

Si tiene alguna duda o desea recibir más información, puede contactar con Dr. Ferran Navarro.

Tel:935537297.

Yo (nombre y apellidos).....

Declaro que el Dr. Ferran Navarro del Servicio de Microbiología me ha explicado acerca del proyecto de investigación titulado "Implicación de plásmidos y bacteriófagos en la difusión de las resistencias en humanos. Epidemiología del plásmido" y declaro que:

1. He recibido información clara y sencilla, oral y escrita, sobre mi participación en el proyecto.
2. He entendido las explicaciones del equipo médico sobre este proyecto y porqué se hace.
3. Me han pedido permiso para que los resultados puedan ser utilizados para investigación.
4. Me han asegurado que mis datos personales serán mantenidos en la más absoluta confidencialidad.
5. Puedo retirar este consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones, comunicando esta decisión al equipo médico.

Por lo cual autorizo de forma libre y voluntaria participar en este proyectode.....de 2013.

Firma del paciente:

Nombre:

Fecha:

Firma del investigador:

Nombre:

Fecha:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente

ANEXO II. Procedimientos experimentales

Protocolo 1. Extracción de ADN genómico por columna (GenElute™ Bacterial Genomic DNA de Sigma-Aldrich)

1. Cultivo overnight en medio de cultivo LB
 - Centrifugar 1,5ml del cultivo bacteriano a 12.000-16.000 g durante 2 minutos y descartar el sobrenadante.
2. Resuspensión de las células
 - Resuspender el *pellet* en 180 µl de *Lysis Solution T*. En este caso, a cada tubo eppendorf se le añadieron un par de perlas de cristal y se agitaron para una mejor ruptura de la pared. De forma opcional, el kit sugiere añadir 20 µl RNasa A e incubarlo a temperatura ambiente durante 2 min.
3. Lisis celular
 - Añadir 20 µl de Proteinasa K a la suspensión celular, mezclar e incubar a 55°C durante 30 minutos.
 - Añadir 200 µl de *Lysis Solution C*, mezclar y volver a incubar a 55°C durante 10 minutos.
4. Preparación de la columna
 - Durante el transcurso de la última incubación, preparar tantas columnas como sean necesarias (1 x muestra) y añadir 500 µl de *Column Preparation Solution* a cada una de ellas.
 - Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto, sacar a columna y descartar el líquido filtrado del tubo. Volver a colocar la columna en el mismo tubo.
5. Unir el ADN a la columna
 - Pasados los 10 minutos de incubación con la *Lysis Solution C*, añadir 200 µl de etanol a la suspensión y mezclar, ya sea en vortex o por inversión del tubo.

- Transferir la suspensión con el etanol a una de las columnas preparadas en el punto 5 sin que las perlas caigan en ella. Centrifugar a 6.500 g durante un minuto.
6. Limpiar la columna
- Transferir la columna a un nuevo tubo colector. Añadir 500 µl de *Wash Solution 1* a la columna y centrifugar a 6.500 g durante 1 minuto.
 - Volver a transferir la columna a un nuevo tubo colector. Añadir 500 µl de *Wash Solution Concentrate* a la columna y centrifugar a 12.000 g durante 3 min para secar la columna. Para asegurarnos de que no queda líquido en la columna, repetir la centrifugación durante un minuto pasando primera la columna a un nuevo tubo colector.
7. Eluir el ADN
- Transferir la columna a un tubo eppendorf, añadir 200 µl de *Elution Solution* y centrifugar a 6.500 g durante un minuto. Mantener congelado si no se usa de forma inmediata.

Protocolo 2. Iniciadores y condiciones de PCR

Antes de que se lleve a cabo la reacción de PCR en el termociclador, es necesaria la preparación de la Master Mix. Esta se lleva a cabo en la sala de Pre-PCR, zona libre de productos de PCR o amplicones para evitar contaminaciones. Una vez terminado el proceso de PCR, el producto de amplificación debe mantenerse refrigerado si va a ser utilizado en los próximos días y si no, debe mantenerse a -20°C. La Master Mix se compone de:

- Agua destilada estéril
- Iniciadores con orientación 5'-3' (*Forward*, Fw) y 3'-5' (*Reverse*, Rv) específicos para la región génica que se quiere amplificar (10mM).
- Tampón 10x con cloruro de magnesio (15mM) (Sigma-Aldrich)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10mM; Sigma-Aldrich)

- Polimerasa Taq Expand 3,5 U/μl (Taq Expand High Fidelity PCR system de Sigma-Aldrich)
- ADN de la muestra que se quiere amplificar

Protocolo 2.1. Caracterización de genes que codifican BLEE, AmpC y carbapenemasas

- **Iniciadores**

	Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
BLEE	<i>bla</i> _{TEMt}	P4	AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG	938
		P3	AGTGTGCGACTTACCAATGCTTAATCAGT	
	<i>bla</i> _{SHVt}	SHV A	CGCCGGGTATTCTTATTGTGCGC	992
		SHV B	TCTTCCGATGCCGCCAGTCA	
	<i>bla</i> _{CTX-M-AB}	CTX-M- A	CTTTACCAGCGTCAGA	393
		CTX-M- B	GCGATGTGCAGTACCAGTAA	
	<i>bla</i> _{CTX-M-9t}	I ATG	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	850
		I STOP	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	
	<i>bla</i> _{CTX-M-3}	CTX-M-3 UP	ATGGTAAAAAATCACTGCG	879
		CTX-M-3 DN	CTATTACAACCGTCGGTG	
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1 UP	AAGGCGTTTTGACAGACTAT	1014	
	CTX-M-1 DN	CCGTTTCCGCTATTACAA		
AmpC	<i>bla</i> _{ACCt}	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
		ACCMR	TTGCCGCAATCATCCCTAGC	
	<i>bla</i> _{CITt}	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
		CITMR	TTTCTCTGAACGTGGCTGGC	
	<i>bla</i> _{DHAt}	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
		DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
	<i>bla</i> _{EBC}	EBCMF	TGCGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
		EBCMR	CTTCCACTGCGGCTGCCAGT	
	<i>bla</i> _{FOX}	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
		FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	
<i>bla</i> _{MOX}	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	
	MOXMR	CACATTGACATAGGTGTGGGTGC		
<i>bla</i> _{CMY-2t}	CMY-2 ATG	ATGATGAAAAAATCGTTATGC	1143	
	CMY-2 STOP	TTGCAGCTTTCAAGAATGCGC		
Carbapenemasas	<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48 UP	CGTTATGCGTGATTAGCCTTAT	393
		OXA-48 DN	TTTTTCCTGTTTGAGCACTTCTTT	
	<i>bla</i> _{GES}	GES 1UP	ATGCGCTTCATTACGCAC	863
		GES 1DN	CTATTTGTCCGTGCTCAGG	
	<i>bla</i> _{IMI}	IMI UP	GTCACCTAATGTA AAAACC	878
		IMI DN	TTAAGGTATCAATTGCG	
	<i>bla</i> _{KPC}	KPC UP	TGCTACTGTATCGCCGTC	880
		KPC DN	TTACTGCCCGTTGACGCC	
	<i>bla</i> _{NMC}	NMC-A UP	GTCACCTAATGTA AAAGCA	878
		NMC-A DN	GGTTATCAATTGCAATTC	
	<i>bla</i> _{SME}	SME UP	CGGCTTCATTTTTGTTTA	884
		SME DN	CAATTGCCTGAATTGCAAT	
	<i>bla</i> _{GIM}	GIM UP	ACTTGAGCGTTGCCAGC	721
		GIM DN	AATCAGCCGACGCTTCAG	
	<i>bla</i> _{IMP}	IMP UP	GAAGGCGTTTATGTTCATAC	740
		IMP DN	GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	
<i>bla</i> _{SPM}	SPM 1A	CTGCTTGGATTATGGGCGC	783	
	SPM 1B	CCTTTTCCGCGACCTTGATC		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM B	ATGGTGTTGGTGCATATC	501	
	VIM F	TGGCCATTGACCCAGATC		

- **Master Mix**

Master Mix (BLEE, carbas)	Volumen 1x	Master Mix (AmpC)	Volumen 1x
H ₂ O destilada estéril	30,5µl	H ₂ O destilada estéril	30µl
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl	Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl
dNTP	5 µl	dNTP	5 µl
Iniciador Fw	2 µl	Iniciadores A*	3 µl
Iniciador Rv	2 µl	Iniciadores B*	2.5 µl
Taq expand	0,5 µl	Iniciadores C*	2 µl
ADN	5 µl	Taq expand	0,5 µl
Total	50 µl	ADN	2 µl
		Total	50 µl

*Pool de iniciadores A, MOXMR, MOXMR, CITMF, CITMR, DHAMF, DHAMR; pool de iniciadores B, ACCMF, ACCMR, EBCMF, EBCMR; pool de iniciadores C, FOXMF, FOXMR

- **Condiciones de PCR**

Condiciones		Ciclos
95°C	1 min	1
95°C	30 seg	
55°C	30 seg	30
72°C	60 seg	
72°C	3 min	1
4°C	∞	

Protocolo 2.2. Tipificación plasmídica PBRT Kit de Diatheva

- **Master Mix y condiciones de PCR**

Master Mix	Volumen 1x	Condiciones		Ciclos
Mix M1*	23,8 µl	95°C	10 min	1
ADN polimerasa	0,2 µl	95°C	60 seg	
Muestra de ADN	2 µl	60°C	30 seg	30
Total	25 µl	72°C	60 seg	
		72°C	5 min	1
		4°C	∞	

*Para cada uno de los viales por separado, del M1 al M8

PCR simples

- Iniciadores:**

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	Referencia
<i>oriV</i>	CoIE-Fw	GTT CGT GCA TAC AGT CCA	187	García-Fernández <i>et al.</i> 2009
	CoIE1-Rv	GGC GAA ACC CGA CAG GACT		
<i>excA/repA</i>	L-Fw	CGG AAC CGA CAT GTG CCT ACT	854	Carattoli <i>et al.</i> 2015
	L/M-Rv	GAA CTC CGG CGA AAG ACC TTC		
<i>excA/repA</i>	M-Fw	GGA TGA AAA CTA TCA GCA TCT GAA G	738	Carattoli <i>et al.</i> 2015
	L/M-Rv	GAA CTC CGG CGA AAG ACC TTC		
<i>taxC</i>	X3-Fw	GTTTCTCCACGCCCTTGTTCA	351	Johnson <i>et al.</i> 2012
	X3-Rv	CTTTGTGCTTGCTATCATA		
<i>taxC</i>	X4-Fw	AGCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT	569	Johnson <i>et al.</i> 2012
	X4-Rv	TACCCCAAATCGTAACCTG		

- Preparación de la Master mix:**

Master Mix	Volumen 1x
H ₂ O destilada estéril	32.75 µl
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl
dNTP	5 µl
Iniciador Fw*	2 µl
Iniciador Rv*	2 µl
Taq expand	0,25 µl
ADN	3 µl
Total	50 µl

*Para cada Master Mix introducir los pares de iniciadores correspondientes

- Condiciones para la PCR:**

Condiciones (X3-X4)			Condiciones (L – M)		
		Ciclos			Ciclos
95°C	5 min	1	94°C	10 min	1
95°C	60 seg		95°C	60 seg	
52°C	30 seg	25	60°C	30 seg	30
72°C	60 seg		72°C	60 seg	
72°C	5 min	1	72°C	5 min	1
4°C	8		4°C	8	

Protocolo 2.3. Subtipificación plasmídica

Los iniciadores y condiciones de PCR necesarios para esta subtipificación se detallan a continuación, pero se pueden encontrar en la página web <https://pubmlst.org/plasmid/>.

Plásmidos IncN: para la asignación de estos plásmidos a un secuenciotipo se requiere de la amplificación y posterior secuenciación de 3 regiones génicas correspondientes a *repN*, *traJ* y *korA* (García-Fernández *et al.* 2011).

- **Iniciadores:**

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
<i>repN</i>	repN-Fw	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	514
	repN -Rv	ACGGTCATTTAACCAAGCATG	
<i>traJ</i>	traJ-Fw	CTTCTCCATAGTTACTGTGCT	636
	traJ -Rv	CATCCACGGCTAAATACCTG	
<i>korA</i>	korA-Fw	GGAACGTTTGTAYCTTGATTG	278
	korA -Rv	ACTCACTATCTTCTGTTGATTG	

- **Master Mix y condiciones para la PCR:**

Master Mix	Volumen 1x	Condiciones (<i>repN-traJ-korA</i>)		Ciclos
H ₂ O destilada estéril	30.75 µl	94°C	5 min	1
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl	94°C	30 seg	30
dNTP	5 µl	60°C	30 seg	
Iniciador Fw	2 µl	72°C	60 seg	1
Iniciador Rv	2 µl	72°C	5 min	
Taq expand	0.25 µl	4°C	8	
ADN	5 µl			
Total	50 µl			

Plásmidos Incl1: para la asignación de estos plásmidos a un secuenciotipo se requiere de la amplificación y posterior secuenciación de 5 regiones génicas correspondientes a *repl*, *arda*, *trbA*, *sogS* y *pilL* (García-Fernández *et al.* 2008).

- **Iniciadores:**

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
<i>repl</i>	repl1-Fw	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	142
	repl1-Rv	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	
<i>arda</i>	ardA-Fw	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	501
	ardA-Rv	TCACCGACGGAACACATGACC	
<i>trbA</i>	trbA-Fw	CGACAAATGCTTCCGGGGT	507
	trbA-Rv	TCTTACAATCGACAGCCTGT	
<i>sogS</i>	sogS-Fw	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	291
	sogS-Rv	AACAGTGATATGCCGTCGC	
<i>pilL</i>	pilL-Fw	CCATATGACCATCCAGTGCG	316
	pilL-Rv	AACCACTATCTCGCCAGCAG	

- **Master Mix y condiciones para la PCR:**

Master Mix	Volumen 1x	Condiciones (alelos Incl1)		Ciclos
H ₂ O destilada estéril	30.75 µl	94°C	5 min	1
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl	94°C	30 seg	30
dNTP	5 µl	60°C	30 seg	
Iniciador Fw	2 µl	72°C	60 seg	
Iniciador Rv	2 µl	72°C	5 min	1
Taq expand	0.25 µl	4°C	8	
ADN	5 µl			
Total	50 µl			

Plásmidos IncF: para la asignación de estos plásmidos a una fórmula FAB se requiere de la amplificación y posterior secuenciación de aquellos replicones F presentes en un único plásmido. Por lo tanto, es necesaria la amplificación de regiones génicas de los replicones FII, FIA, FIB y FIIK (Villa *et al.* 2010).

- **Iniciadores:**

Gen	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)
<i>copA</i>	FII-Fw	CTGATCGTTTAAGGAATTTT	258-262*
	FII -Rv	CACACCATCCTGCACTTA	
<i>Iterones/repE</i>	FIA -Fw	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462-409*
	FIA -Rv	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	
<i>repB</i>	FIB -Fw	TCTGTTTATTCTTTACTGTCCAC	683
	FIB -Rv	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	
<i>copA</i>	FIIK -Fw	TCTTCTTCAATCTTGCGGGA	142-148*
	FIIK -Rv	GCTTATGTTGCACRGAAGGA	

*Se pueden obtener amplicones de tamaño variable para estos genes

- **Master Mix y condiciones para la PCR:**

Master Mix	Volumen 1x	Condiciones (replicones F)		Ciclos
H ₂ O destilada estéril	30.75 µl	94°C	5 min	1
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl	94°C	60 seg	30
dNTP	5 µl	60°C*	30 seg	
Iniciador Fw	2 µl	72°C	60 seg	1
Iniciador Rv	2 µl	72°C	5 min	
Taq expand	0.25 µl	4°C	8	
ADN	5 µl			
Total	50 µl			

*La temperatura de hibridación para los iniciadores FII es de 54°C

Protocolo 2.4. Determinación del grupo filogenético de las cepas de *E. coli*

- **Iniciadores:**

PCR	Gen	Iniciadores	Secuencia 5' – 3'	Amplicón (pb)	Referencia
<i>Cuadruplex</i>	<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	Clermont <i>et al.</i> 2013
		chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAGACA		Clermont <i>et al.</i> 2000
	<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	Clermont <i>et al.</i> 2013
		yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	TspE4.C2	TspE4C2.1b	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	Clermont <i>et al.</i> 2013
		TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	Clermont <i>et al.</i> 2013	
	ArpA1.r	TCTCCCATACCGTACGCTA		Clermont <i>et al.</i> 2004	
Grupo E	<i>arpA</i>	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	Lescat <i>et al.</i> 2012
Grupo C	<i>trpA</i>	trpAgpC.1	AGTTTATGCCAGTGCGAG	219	Lescat <i>et al.</i> 2012
		trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTACGCCC		

Tabla adaptada de Clermont *et al* (Clermont 2013)

- **Master Mix**

Mix iniciadores		
Iniciadores	Concentración (pmol)	Volumen (μl)
chuA.1b	20	20
chuA.2	20	20
yjA.1b	20	20
yjA.2b	20	20
TspE4C2.1b	20	20
TspE4C2.2b	20	20
AceK.f	40	40
ArpA1.r	40	40
TOTAL		200

Master Mix	Volumen 1x
H ₂ O destilada estéril	11.75 μl
Tampón 10x + MgCl ₂	2 μl
dNTP (200μM)	2 μl
Mix iniciadores (10pmol)	2 μl
Taq expand (5U/ μl)	0,25 μl
ADN	2 μl
Total	20 μl

- **Condiciones de PCR**

Condiciones (cuádruplex, grupo C)		Ciclos
94°C	4 min	1
94°C	5 seg	
59°C	20 seg	30
72°C	60 seg	
72°C	5 min	1
4°C	8	

Condiciones (grupo E)		Ciclos
94°C	4 min	1
94°C	5 seg	
57°C	20 seg	30
72°C	60 seg	
72°C	5 min	1
4°C	8	

Protocolo 2.5. Detección de factores de virulencia en las cepas de *E. coli*

- **Iniciadores**

Iniciadores	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	TA
fimH -Fw	TCGAGAACGGATAAGCCGTGG	508	65°C
fimH -Rv	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
ibeA -Fw	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	171	65°C
ibeA -Rv	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC		
cnf -Fw	ATCTTATACTGGATGGGATCATCTTGG	974	60°C
cnf -Rv	GCAGAACGACGTTCTTCATAAGTATC		
fyuA -Fw	TGATTAACCCCGACGGGAA	787	60°C
fyuA -Rv	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA		
clbB -Fw	GATTTGGATACTGGCGATAACCG	579	60°C
clbB -Rv	CCATTTCCCGTTTGAGCACAC		
hra -Fw	CGAATCGTTGTACGTTTCAG	162	58°C
hra -Rv	TATTTATCGCCCACTCGTC		
hlyD -Fw	CTCCGGTACGTGAAAAGGAC	904	58°C
hlyD -Rv	GCCCTGATTACTGAAGCCTG		
clbN -Fw	GTTTTGCTCGCCAGATAGTCATTC	733	60°C
clbN -Rv	CAGTTCGGGTATGTGTGGAAGG		
usp -Fw	ACATTACGGCAAGCCTCAG	440	60°C
usp -Rv	AGCGAGTTCCTGGTCAAAGC		
iroN -Fw	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	667	65°C
iroN -Rv	GACGCCGACATTAAGACGCAG		
iutA -Fw	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	300	65°C
iutA -Rv	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
iss -Fw	CTCCGGTACGTGAAAAGGAC	323	62°C
iss -Rv	GCCCTGATTACTGAAGCCTG		
ompT -Fw	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	559	60°C
ompT -Rv	CCCGGGTCAATAGTGTTTCATC		
traT -Fw	GGTGTGGTGCATGAGCACAG	290	60°C
traT -Rv	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG		
hlyF -Fw	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAAC	444	62°C
hlyF -Rv	TTTGCGGTTTAGGCATTCC		

TA, temperatura de *annealing* (hibridación)

- **Master Mix y condiciones de PCR**

Master Mix	Volumen 1x
H ₂ O destilada estéril	30.75 µl
Tampón 10x + MgCl ₂	5 µl
dNTP	5 µl
Iniciador Fw	2 µl
Iniciador Rv	2 µl
Taq expand	0.25 µl
ADN	5 µl
Total	50 µl

Condiciones		Ciclos
94°C	5 min	1
94°C	30 seg	30
TA*	30 seg	
72°C	60 seg	
72°C	5 min	1
4°C	∞	

*TA según los iniciadores a utilizar

Protocolo 2.6. Síntesis de sondas para el proceso de hibridación

- **Master Mix**

Reactivos	MM para la sonda	MM para el control +
H ₂ O destilada estéril	27,25 µl	27,25 µl
Tampón (Vial 3)	5 µl	5 µl
DIG-Probe (Vial 2)	5 µl	--
dNTP (vial 4)	--	5 µl
Iniciador Fw	5 µl	5 µl
Iniciador Rv	5 µl	5 µl
Enzima Mix (Vial 1)	0,75 µl	0,75 µl
ADN molde	2 µl	2 µl
Total	50 µl	50 µl

- **Condiciones de PCR**

Condiciones		Ciclos
95°C	2 min	1
95°C	30 seg	30
TA	30 seg	
72°C	40 seg	
72°C	7 min	1
4°C	8	

TA, temperatura de *annealing* (hibridación). Esta depende de los iniciadores utilizados.

Protocolo 3. Electroforesis de corriente continua en gel de agarosa

Visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

TAMPONES Y REACTIVOS

- Tampón TBE:
 - TBE 5x 2L: 108 g de trizma, 55 g de ácido bórico, 7,5 g de EDTA y, enrasar con agua destilada estéril hasta 2L.
 - TBE 0,5x 1L: 100 ml TBE 5x y 900 ml de agua destilada estéril.
- Tampón de carga: 0.124 g de azul de bromofenol, 25 ml de glicerol y agua destilada hasta los 50 ml.
- Marcador de peso molecular (67-1114 pb): 75 μ L de agua destilada estéril, 10 μ L de tampón de carga y 15 μ L de *DNA molecular weight VIII* (Roche).
- Agarosa (Roche)

PROCEDIMIENTO:

- Elaboración del gel de agarosa 2%:
 1. Pesar 3 g de agarosa y mezclarlos con 150 ml de tampón TBE 0,5x.
 2. Calentar a 900W hasta que la agarosa quede completamente disuelta.
 3. Dejar enfriar a temperatura ambiente unos 10 minutos.
 4. Durante estos 10 minutos, preparar el molde de electroforesis colocando los peines que posteriormente generarán los pocillos donde se verterá la muestra.
 5. Una vez transcurridos estos 10 minutos, añadir 7 μ L de bromuro de etidio y mezclar suavemente moviendo el recipiente de forma circular.
 6. Verter el contenido al molde de electroforesis y dejar a temperatura ambiente hasta que se solidifique formando el gel.
 7. Una vez sólido, retirar los peines, colocar el molde adecuadamente en la cubeta de electroforesis y llenarla con tampón TBE 0,5x hasta cubrir el gel.

- Carga del gel con el producto de PCR:
 1. Mezclar 8 μL del producto de PCR con 2 μL de tampón de carga.
 2. Introducir los 10 μL de la mezcla de tampón de carga y producto de PCR en el pocillo del gel procurando no generar burbujas al soltar el líquido (cada muestra en un pocillo). Mismo procedimiento para los controles positivo y negativo.
 3. Introducir el marcador molecular en el primer y último pocillo, según las muestras a cargar, de tal forma que la comparación de pesos moleculares de las muestras sea sencilla.
 4. Conectar la cubeta a la fuente de potencia y correr el gel a 100-120 V hasta que los fragmentos se separen (procurar que el tampón de carga no llegue al final del gel).
 5. Colocar el gel en el transiluminador de luz UV para la visualización de las bandas y capturar una imagen si es necesario.

Protocolo 4. Purificación de los productos de PCR

Protocolo 4.1. High Pure PCR Product Purification Kit

1. Rotular una columna y un tubo colector por muestra a purificar.
2. Poner cada columna dentro del tubo colector.
3. Añadir 50 μL de producto de PCR y 250 μL de *Binding buffer* en la columna.
4. Centrifugar a 14.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 1 minuto.
5. Apartar la columna y desechar el líquido recogido en el tubo colector. Volver a colocar la columna.
6. Añadir 500 μL de *Washing Buffer* en la columna y centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
7. Apartar la columna y desechar el líquido recogido en el tubo colector. Volver a colocar la columna.
8. Añadir 200 μL de *Washing Buffer* en la columna y centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.

9. Desechar el líquido recogido junto con el tubo colector y poner la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml debidamente rotulado.
10. Añadir agua destilada (eluyente). Dependiendo de la intensidad de la banda en el gel de electroforesis añadir: 10-20 μL si esta banda es tenue o 30-40 μL si la banda es intensa.
11. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
12. Cerciorarse de que en el tubo eppendorf hay líquido y luego tirar la columna. Guardar el producto purificado en la nevera o congelas a -20°C si su uso se posterga.

Protocolo 4.2. ExoSAP-IT PCR purification Clean up Reagent

1. Rotular tantos tubos de PCR como muestras quieran ser purificadas.
2. Sacar el reactivo ExoSAP-IT del congelador de -20°C y mantenerlo en hielo durante todo el procedimiento.
3. Mezclar 10 μL de producto de amplificación con 4 μL de reactivo ExoSAP-IT.
4. Incubar en el termociclador con un programa de un ciclo a 37°C durante 15 minutos para degradar los cebadores y nucleótidos restantes y otro ciclo a 80°C durante 15 minutos para inactivar el reactivo ExoSAP-IT.
5. Los productos de PCR tratados pueden almacenarse a -20°C hasta que se requieran.

Protocolo 5. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

TAMPONES Y REACTIVOS

- Tampón TE a pH 8 (para 1L): 1,212 g de Tris-Base, 0,372 g de EDTA, enrasar con agua destilada hasta 1L.
- Tampón CSB a pH 8 (para 1L): 12,12 g de Tris-Base, 37,2 g de EDTA, enrasar con agua destilada hasta 1L.

- Tampón CLYSISB (para 500 mL): 5 g SLS en 100 ml de agua, disolver y añadir 250 ml de tampón CSB, enrasar con agua destilada a 500 ml.
- Tampón Tris-HCl 1M pH 7,5 (para 200 ml): 24,2 g Tris-Base en 200 ml de agua destilada.
- Tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 (para 500 ml): 5 ml Tris-HCl 1M en 500 ml de agua destilada.
- Proteinasa K 50 mg/ml (Sigma-Aldrich – 100 mg): disolver con 2 ml de agua destilada estéril y alicuotar. Conservar a -20°C hasta su uso.
- Tampón ES pH 9 (para 100 ml): 18,61 g de EDTA en 70ml de agua. Ajustar pH, enrasar a 100 ml con agua y añadir 1 g de SLS.
- TBE 10x (para 1L): 121,5 g de Trizma, 0,745 g de EDTA, 61,8 g de ácido bórico, enrasar a 1L con agua destilada.
- TBE 0,5x (para 1L): 50 ml de TBE 10x y 950 ml de agua destilada.
- Thiourea 0,1M.
- Agarosa Incert™ (Lonza) para los insertos.
- Agarosa Seakem Gold Agarose para el gel (Lonza).
- Marcador de peso molecular Lambda Ladder (BioRad)

Específicos para S1-PFGE:

- Tampón S1 (para 50 ml): 25 ml NaCl (100 mM, estéril), 20 ml de acetato de sodio (75 mM pH 4,5), 5ml ZnSO₄ (50 mM).
- Enzima S1 (Promega): se prepara una dilución 1/75 con tampón S1 en el momento de la digestión del inserto. Mantener en frío y congelar posteriormente.

Específico para ICEul-PFGE:

- Tampón, BSA y enzima ICEul de (New England BioLabs Inc.)

PROCEDIMIENTO

1. Preparación de los insertos, lisis celular y lavados

- » DIA 1
 - » Siembra en agar sangre (Biomérieux) de las cepas de interés e incubación a 37°C durante 18h.
- » DIA 2
 - » Preparar la agarosa al 2% en TE pH 8 para los insertos

$$(N^{\circ} \text{muestras} + 1) \times 300 \mu\text{l TE} = X \text{ml TE}$$

$$\frac{X \text{ ml TE} \times 2 \text{ g}}{100} = X \text{ g de agarosa}$$

Pesar la agarosa, medir el TE necesario y añadirlo en un tubo estéril de 5 ml. Calentar en llama o microondas para disolver la agarosa y mantenerla a 55°C en un *heatblocker* o al baño hasta el momento de uso.

- » Resuspender aproximadamente una porción equivalente a media asa bacteriológica de masa bacteriana para el S1-PFGE y una porción inferior, de 3 a 5 colonias, para el ICeul-PFGE, de cada muestra en 1 ml de CSB y agitar hasta obtener una solución homogénea. Alicuotar 250 µl de esta suspensión, añadir 1,5 µl de proteinasa K (50 mg/ml) y mezclar.
- » Para la preparación del inserto, se mezclan los 250 µl de suspensión bacteriana con 250 µl de la agarosa atemperada que se dejó en el *heatblocker* al inicio del proceso. A continuación, se dispensan los 500 µl de mezcla en los moldes, cantidad que da para 4-5 insertos, y se deja solidificar a 4°C durante 30 min.
- » Durante este tiempo, preparar un baño a 55°C para la lisis celular y otro a 37°C. En este último poner a atemperar agua destilada estéril y TE (se usará para los posteriores lavados de los insertos).

- » Una vez solidificados los insertos se pasa a lisar las células. Para ello, se depositan los insertos en eppendorfs de 2 ml (1 eppendorf por muestra), se añade tampón ClysisB hasta cubrirlos y 12 µl de proteinasa K. Incubar en el baño de 55°C durante 2h con agitación moderada.
- » Transcurrido este tiempo, se procede al lavado de los insertos. Se cogen tantos insertos como se vayan a utilizar y se transfieren a un nuevo eppendorf. Se realizan dos lavados con agua destilada estéril de 10 min de duración cada uno en el baño de 55°C con agitación y tres lavados más con TE a la misma temperatura y durante el mismo tiempo cada uno de ellos. Mantener a 4°C hasta el momento de digerir.

2. Digestión con enzimas de restricción

- » DIA 2 o 3
 - » Una vez lavados, se corta 1/3 del inserto por lo que, de cada inserto, podemos obtener dos fragmentos que podrán ser utilizados al correr el gel. Cada fragmento, sea de la misma o distinta cepa, se coloca en un nuevo eppendorf de 1,5ml.
 - » **Digestión con enzima S1:** Añadir 200 µl de Tris-HCl 10 mM a cada eppendorf con inserto y se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Pasado este tiempo se retira el líquido y se repite el proceso.
 En un eppendorf a parte mezclar la enzima S1 con tampón S1 a una proporción 1/75 (ej. 2 µl enzima S1 + 148 µl Tampón S1) y mantener en hielo. Seguidamente preparar la MM: 0,2 ml Tampón S1 + 0,28 µl enzima S1 (1/75) por muestra.
 Una vez transcurrido el tiempo de incubación a temperatura ambiente, eliminar el Tris-HCl y poner 200 µl de la MM para cada inserto. Incubar durante 1h y 30 min en un baño a 37°C con agitación moderada.
 Transcurrido el tiempo de digestión, eliminar el tampón con la enzima y añadir 150 µl de tampón ES. Mantener en hielo hasta el momento de cargar el gel.

- » **Digestión con enzima ICeul:** Preparar la MM: (176,4 µl de agua destilada, 20 µl de Tampón, 2 µl de BSA y 1,6 µl de enzima ICeul) x cada muestra.
Repartir 200 µl de la MM para cada inserto. Incubar durante 3h en un baño a 37° con agitación moderada. Transcurrido el tiempo de digestión, mantener en hielo hasta el momento de cargar el gel.

3. Preparación del gel y el CHEF

- » DIA 2 o 3
 - » Durante los tiempos de digestión se procede a preparar tanto el gel de agarosa como el CHEF. Se prepara un gel de agarosa al 1% (agarosa Seakem y TBE 0,5x) y se mantiene a 55°C en un baño en agitación hasta el momento de uso.
 - » Vaciar la cubeta del CHEF, la cual se mantiene con agua, llenarla con 2,3 L de TBE 0,5x y añadir 750 µl de tiourea al 0,1 M por cada litro de tampón. Encender la refrigeración programándola a 14°C.
 - » Sacar la agarosa del baño para que se atempere mientras se prepara el molde con el peine y se colocan los fragmentos de los insertos ya digeridos y el marcador de peso molecular sobre el peine. Sacar el exceso de líquido de los fragmentos para que se adhieran bien al peine y verter la agarosa en la cubeta evitando vibraciones para que los insertos no se suelten. Una vez que el gel se solidifica, poner el gel en la cubeta y programar el CHEF DRII *Power Module* a un ángulo de 120°, 6 voltios/cm y con los siguientes ciclos:
 - S1-PFGE:
 1. 5s – 25s → 6h
 2. 30s – 45s → 18h
 - ICeul-PFGE:
 1. 20s – 120s → 12h
 2. 60s – 100s → 12h

4. Tinción y visualización del gel

- » Día 3 o 4
 - » Finalizado el tiempo de corrida, sacar el gel y ponerlo en una cubeta con parte del TBE 0,5x utilizado en la corrida hasta cubrirlo. Añadir 40 µl de BrEt y ponerlo en agitación suave durante 30 min. Pasado este tiempo mantener el gel a 4°C.
- » Día 4 o 5
 - » Colocar el gel en el transiluminador de luz UV para la visualización de las bandas y capturar una imagen.

Protocolo 6. *Southern blot* e hibridación

TAMPONES Y REACTIVOS

Transferencia

- Solución de despurinización (HCl 0,25 M): 11 ml de HCl al 35% en 400 ml de agua destilada y enrasar hasta 500 ml. Se prepara en el momento de usarla.
- Solución de desnaturalización (NaOH 0,5M +NaCl 1,5M): disolver 87,66 g de NaCl en unos 600 ml de agua destilada, añadir 20 g de NaOH y enrasar hasta 20ml.
- Solución de neutralización (NaCl 1,5 M + Trizma 0,5 M a pH 7,5): disolver 87,66 g en unos 600 ml de agua destilada, añadir 60,57 g de Trizma, agustar el pH y enrasar a 1L.
- SSC 20x (para 2L): disolver 176,4 g de citrato de sodio deshidratado y 350,6 g de NaCl en 1,5L de agua destilada, ajustar pH 7, enrasar a 2L.
- SSC 10x, 5x y 2x

Hibridación y detección

- Tampón de hibridación DIG Easy Hyb (Sigma-Aldrich): facilita la difusión de las sondas y reduce el secado del ADN durante las reacciones de hibridación.
- *Low stringency buffer* (SSC 2x, 0,1% SDS): 100 ml de SSC 20x, 1 g de SDS y enrasar a 1 L.
- *High stringency buffer* (SSC 0,5x, 0,1% SDS para bajo contenido en GC): 100 ml de SSC 5x, 1 g de SDS y enrasar a 1 L.
- *Maleic acid buffer* 10x pH 7,5 (para 1 L): 116 g de ácido maleico, 87,6 g de NaCl, ajustar pH y enrasar a 1 L con agua destilada
- *Maleic acid buffer* 1x pH 7,5 (para 1 L): 100 ml de *Maleic acid buffer* 10x pH 7,5 y 900 ml de agua destilada
- *Washing buffer* 1x (para 500 ml): 50 ml de *Maleic acid buffer* 10x pH 7,5 y 1,5 ml de Tween 20. Enrasar a 500 ml con agua destilada.
- *Blocking reagent* 50 g (Sigma-Aldrich): la *blocking solution* 10x debe prepararse antes de empezar el proceso. Preparar 500 ml de ácido maleico 1x e ir añadiendo los 50 g de *Blocking reagent* poco a poco, para evitar la formación de burbujas, con agitación fuerte y atemperando el tampón a no más de 65°C. Una vez esté bien mezclado, hacer alícuotas de 10 ml y congelar hasta el momento de uso.
- *Blocking solution* 1x (preparar en el momento de uso): 10 ml de *blocking solution* 10x y 90 ml de ácido maleico 1x.
- *Detection Buffer* 1x pH 9,5: 12,1 g de Trizma, 5,84 g de NaCl, ajustar pH y enrasar a 1 L con agua destilada.
- *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche) que consta de:
 - *Anti-digoxigenin-AP Fab fragments*
 - CSPD (sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina)
- *Antibody solution* 1x (preparación en el momento de uso): 2 µl de *Anti-digoxigenin-AP* en 20 ml de *Blocking solution* 1x.

Deshibridación

- Solución de deshibridación (0,2 M de NaOH, 0,1% SDS): 8 g de NaOH y 1 g de SDS en un litro de agua destilada.
- SSC 2x

PROCEDIMIENTO

TRANSFERENCIA:

1. Preparación del gel (PFGE)

- » Después del rebelado del gel de PFGE, colocarlo en una cubeta para proceder a los lavados del gel previos a la transferencia. Cada lavado se realiza en una cubeta distinta, por lo tanto, se debe ir con cuidado para que este no se rompa en cada manipulación.
- » Cubrir el gel con agua destilada durante 5 min en agitación suave para eliminar el exceso de BrEt. Durante este tiempo preparar la solución de despurinización.
- » Cubrir el gel con la solución de despurinización durante 25 min en agitación suave.
- » Volver a cubrir el gel con agua destilada durante 5 min en agitación suave para eliminar el exceso de la solución anterior.
- » Cubrir el gel con la solución de desnaturalización durante 30 min en agitación suave.
- » Volver a cubrir el gel con agua destilada durante 5 min en agitación suave para eliminar el exceso de la solución anterior.
- » Cubrir el gen con la solución de neutralización durante 30 min en agitación suave.

2. Preparación de la membrana

- » Durante estos 30 min, se procede a preparar la membrana y la unidad de transferencia (máquina de vacío).

- » Cortar la membrana Hybond®-N+ (Sigma-Aldrich) y el papel de filtro Whatmann 3MM (Fisher Scientific) al tamaño del gel, dejando 1 cm más por cada lado.
- » Humedecer el papel Whatmann y la membrana con SSC 2x.
- » Colocar el papel Whatmann sobre el soporte poroso de la unidad de transferencia (modelo 785, BioRad) y la membrana encima de este. Después colocar de forma centrada una ventana de plástico con el tamaño del gel y marcar las esquinas con lápiz.

3. Transferencia

- » Pasado el tiempo de neutralización, pasar el gel a otra cubeta y cubrirlo con agua destilada durante 5 min con agitación suave.
- » Colocar el gel sobre la membrana en la unidad de transferencia y procurar que quede centrado dentro de la ventana de plástico previamente colocada. Evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana.
- » Con cuidado, marcar con un lápiz los pocillos cargados para poder visualizar posteriormente el inicio de cada muestra.
- » Sellar con agarosa todos los bordes del gel y los pocillos. A continuación, colocar el *sealing frame* para sellar bien la unidad de transferencia.
- » Conectar la bomba de vacío (BioRad) a la unidad de transferencia y ajustar la presión a 3-4 inc Hg.
- » Cubrir la superficie del gel con SSC 10x (repetir cada 30 min para hidratarlo) e iniciar el proceso de transferencia durante 2-3 h.
- » Transcurrido este tiempo, para comprobar si el proceso de transferencia ha sido correcto, volver a teñir el gel con BrEt y observar la ausencia de bandas en el transiluminador.
- » Lavar la membrana con SSC 2x durante dos minutos en agitación para eliminar los restos de agarosa.
- » Colocar la membrana sobre papel de filtro y ponerlo a 80°C durante 30 min para terminar de fijar el ADN.

- » Si la membrana no se usa al momento, guardar entre papel de filtro envolviendo con papel de aluminio a 4°C.

HIBRIDACIÓN:

1. Proceso de prehibridación de la membrana

- » El primer paso es determinar la temperatura de hibridación de acuerdo con las características de la sonda, la diana y el tampón de hibridación, en este caso, DIG Easy Hyb (Sigma-Aldrich). Para calcular la temperatura óptima de hibridación (Thib) con este tampón se utiliza la ecuación descrita a continuación:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - 600/l$$

$$Thib = T_m - (20^\circ \text{ to } 25^\circ \text{ C})$$

Donde: T_m es el punto de fusión de la sonda; (% G + C) es el % de G y C en la secuencia de la sonda; Thib es la temperatura óptima para la hibridación de la sonda a la diana con el tampón DIG Easy Hyb; y l es la longitud de la sonda en pares de bases.

En este proyecto, se estandarizó la temperatura de hibridación para todas las sondas utilizadas a 42°C.

- » Precalentar 20 ml del tampón de hibridación a 42°C en el mismo horno de hibridación.
- » Situar la membrana enrollada en un tubo de hibridación procurando evitar la formación de burbujas de aire entre el tubo y la membrana ya que podría dificultar la hibridación de la sonda a la membrana.
- » Verter los 20 ml de tampón de hibridación precalentado en el tubo de hibridación con la membrana y colocar en el horno de hibridación a 42°C durante un mínimo de 30 min con rotación rápida.

2. Proceso de hibridación de la membrana

- » La concentración de la sonda debe ser de unos 5-20 ng por ml de tampón de hibridación. Equivaldría a unos 2-5 μ l de la sonda obtenida por PCR.
- » Poner 5 μ l de la sonda en un eppendorf con 45 μ l de agua destilada estéril y hervir en un paño con agua durante 5 min para desnaturalizar la sonda. Pasado este tiempo poner la sonda en hielo de inmediato durante un mínimo de 5 min.
- » Pasados los 30 min de prehibridación, sacar el tampón de hibridación del tubo, hacer un *spin* a la sonda desnaturalizada y mezclar todo el contenido con el tampón de hibridación. Homogeneizar bien la solución y volver a verter el contenido en el tubo de hibridación con la membrana.
- » Poner el tubo de nuevo en el horno de hibridación a 42°C con rotación moderada durante unas 16 h (*overnight*).

3. Lavados de la membrana

- » Previo a empezar con los lavados, se deben sacar 10 ml de *blocking solution* 10x del congelador y dejarlo a temperatura ambiente hasta el momento de uso. También se debe programar un horno de hibridación a 65°C y poner el *High stringency buffer* a atemperar. Preparar otro horno de hibridación a 37°C para la incubación final de la membrana.
- » El primer paso es retirar la solución de hibridación del tubo de hibridación donde tenemos la membrana. Esta solución de hibridación puede guardarse a -20°C. Si se quiere reutilizar, antes se debe poner a 68°C para desnaturalizar la sonda.
- » Sacar la membrana del tubo de hibridación con cuidado y colocarla en una cubeta del tamaño adecuado para que la membrana se mantenga completamente estirada.
- » Cubrir la membrana con *Low stringency buffer* y mantenerlo en agitación a temperatura ambiente durante 5 min. Retirar el líquido y repetir este proceso una segunda vez.

- » Volver a poner la membrana enrollada en un tubo de hibridación y añadir 100 ml de *High stringency buffer* previamente atemperado. Volver a poner en el horno de hibridación de 65°C durante 15 min con rotación. Retirar el líquido y repetir el proceso una segunda vez.
- » Retirar el líquido, poner la membrana en una cubeta y cubrir con *Washing buffer 1x* en agitación durante 5 min.

4. Detección

- » Cubrir la membrana con *blocking solution 1x* durante 30 min en agitación. Esta solución se prepara al momento con: los 10 ml de *blocking solution 10x* que hemos dejado descongelando al inicio y 90 ml de ácido maleico 1x.
- » Transcurridos 25 min del paso anterior, centrifugar el vial con *Anti-digoxigenin-AP* del *DIG Luminiscent Detection Kit* a 10.000 rpm durante 5 min.
- » Pasados los 30 min, apartar 20 ml de *blocking solution 1x* utilizado en el primer paso y descartar el resto.
- » Preparar la *Antibody solution 1x*: Añadir 2 µl de *Anti-digoxigenin-AP* a los 20 ml de *blocking solution 1x* apartados.
- » Colocar la membrana en una cubeta pequeña y añadir la *Antibody solution 1x* procurando que cubra toda la superficie de la membrana. Mantener a temperatura ambiente durante 30 min con agitación suave.
- » Poner la membrana en otra cubeta, cubrirla con *Washing buffer 1x* y mantener en agitación durante 5 min. Retirar el líquido y repetir el proceso una segunda vez.
- » Retirar la solución y poner 25 ml de *Detection Buffer 1x*. Mantener en agitación durante 5 min.
- » Colocar la membrana entre las láminas de una bolsa de hibridación procurando que quede completamente extendida. Añadir 2 ml del sustrato CSPD impregnando la zona donde se encuentra el ADN. Cubrir con la lámina superior de la bolsa de hibridación de tal forma que el CSPD se extienda de manera uniforme sobre la membrana procurando, sobre todo, que no queden

burbujas de aire. Cubrir la bolsa con papel de aluminio y dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 min.

- » Incubar la membrana a 37°C durante 15 min.
- » Para la captura de la imagen de la membrana se utilizó G:BOX Chemi XRQ de Syngene, capaz de captar imágenes de quimioluminiscencia entre otras.
- » Una vez se tiene la imagen, si no se quiere proceder a una segunda hibridación de esta misma membrana, pasar la membrana a una cubeta, hacer un lavado con la solución SSC 2x, dejar secar a temperatura ambiente y guardar a 4°C.

5. Deshibridación

- » Si se requiere de otro proceso de hibridación, primero debe eliminarse la primera sonda.
- » Una vez capturada la imagen con la primera sonda, colocar la membrana en una cubeta y lavar con agua destilada durante un minuto en agitación
- » Colocar la membrana en un tubo de hibridación y verter 100 ml de solución de deshibridación. Poner el tubo en el horno de hibridación durante 15 min con rotación rápida. Repetir el proceso una segunda vez.
- » Sacar la membrana del tubo de hibridación, lavar con SSC 2x y guardar entre papel de filtro y cubierta con papel de aluminio a 4°C hasta el momento de volverla a hibridar.

ANEXO III. Alelos y RST de plásmidos IncF

Muestra	Microorganismo	Cepa	Alelos				RST*
			FIIK	FII	FIA	FIB	
MF	<i>E. coli</i>	SP3		24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP7		18		1	F18:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP4		24		23	F24:A-:B23
MF	<i>E. coli</i>	SP11		29		1	F29:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP8		29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP10		24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP12		99		45	F99:A-:B45
MF	<i>E. coli</i>	SP13		1	1	1	F1:A1:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP14		45		10	F45:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP15		2	6	32	F2:A6:B32
MF	<i>E. coli</i>	SP17		29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP18		29		65	F29:A-:B65
MF	<i>E. coli</i>	SP19		59		1	F59:A-:B1/F59:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP21		13		20	F13:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	SP23		2			F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP26				20	F-:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	SP27		29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP29		2	5	10	F2:A5:12
MF	<i>E. coli</i>	SP31		1	1	66	F1:A1:B66
MF	<i>E. coli</i>	SP32		102	17		F102:A17:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP33		102	1	1	F102:A1:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP34		95		64	F95:A-:B64
MF	<i>E. coli</i>	SP35		29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP37		100			F100:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP38		2	1		F2:A1:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP39	7				K:7:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP41		2		65	F2:A-:B65/F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP42		104		67	F104:A-:B67
MF	<i>E. coli</i>	SP43		29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	SP46		1		50	F1:A-:B50/F1:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP47		1		20	F1:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	SP44		2			F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	SP45		18		1	F18:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	SP48		100			F100:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	UB2		18		6	F18:A-:B6
MF	<i>E. coli</i>	UB3			1	1	F-:A1:B1

MF	<i>E. coli</i>	UB4		1	1	F-:A1:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB5	24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB6		1	10	F-:A1:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB14	2		10	F2:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB7	9			F9:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	UB15	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB9	24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB11	101			F101:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	UB12	ND			ND
MF	<i>E. coli</i>	UB13			64	F-:A-:B64
MF	<i>E. coli</i>	UB17	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB18	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB40	18	6	26	F18:A6:B26
MF	<i>E. coli</i>	UB20	2			F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	UB21	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB23		1	10	F-:A1:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB24	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB26	101			F101:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	UB27	2		1	F2:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB28	18		1	F18:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB31	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB32	18	5	1	F18:A5:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB34	24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	UB35	2		10	F2:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB36	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB38	18		20	F18:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	UB41	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	UB42	29			F29:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC01	4		10	F4:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC03	64		27	F64:A-:B27
MF	<i>E. coli</i>	HC04	29		10	F29:A-:B10/F29:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC05	4		10	F4:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC06	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC07	1		20	F1:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	HC08	4		10	F4:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC09	18	5	1	F18:A5:B1
MF	<i>E. coli</i>	HC10	64			F64:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC11	95		65	F95:A-:B65
MF	<i>E. coli</i>	HC12	95	4	1	F95:A4:B1/F95:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC014	24		50	F24:A-:B50
MF	<i>E. coli</i>	HC15	57		16	F57:A-:B16

MF	<i>E. coli</i>	HC017	4			F4:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC18	ND			ND
MF	<i>E. coli</i>	HC19	2	1	10	F2:A1:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC20	1	1	16	F1:A1:B16
MF	<i>E. coli</i>	HC21	2			F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	HC22	51		10	F51:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC24	24		68	F24:A-:B68
MF	<i>E. coli</i>	HC25	103		28	F103:A-:B28
MF	<i>E. coli</i>	HC26	24		68	F24:A-:B68
MF	<i>E. coli</i>	HC27	1	1	1	F1:A1:B1
MF	<i>E. coli</i>	HC30	ND		10	ND
MF	<i>E. coli</i>	HC31	98		65	F98:A-:B65
MF	<i>E. coli</i>	HC33	2	1	10	F2:A1:B10
MF	<i>E. coli</i>	HC34	98		65	F98:A-:B65
MF	<i>E. coli</i>	VH1	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	VH2	18		20	F18:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	VH3	18		20	F18:A-:B20
MF	<i>E. coli</i>	VH5		1	10	F-:A1:B10
MF	<i>E. coli</i>	VH6	29		10	F29:A-:B10/F29:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	VH7	35			F35:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	VH8	2		1	F2:A-:B1/F2:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	VH9	2		1	F2:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH10	18		40	F18:A-:B40
MF	<i>E. coli</i>	VH11	ND		10	ND
MF	<i>E. coli</i>	VH12	2		1	F2:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH14	18		1	F18:A-:B1/F18:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	VH15	35		1	F35:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH16	29		10	F29:A-:B10
MF	<i>E. coli</i>	VH17	2	17	56	F2:A17:B56
MF	<i>E. coli</i>	VH18	24		1	F24:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH19	95		1	F95:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH20	18			F18:A-:B-
MF	<i>E. coli</i>	VH23			1	F-:A-:B1
MF	<i>E. coli</i>	VH24	18		1	F18:A-:B1
MF	<i>K. pneumoniae</i>	SPKp01	4			K4:A-:B-
MF	<i>K. pneumoniae</i>	SPKp02	4			K4:A-:B-
MF	<i>K. pneumoniae</i>	SPKp04	17			K17:A-:B-
MF	<i>K. pneumoniae</i>	SPKp05	7			K7:A-:B-
MF	<i>K. pneumoniae</i>	HCKp01	6			K6:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP002.H	1	1	1	F1:A1:B1

H	<i>E. coli</i>	HSP003.H	31	4	1	F31:A4:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP004.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP006.H	1	6		F1:A6:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP009.H	2		1	F2:A-:B1/F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP013.H	31	4	1	F31:A4:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP014.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP015.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP016.H	29		10	F29:A-:B10/F29:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP018.H		1	1	F-:A1:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP020.H	1	2	20	F1:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP021.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP022.H	24		20	F24:A-:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP024.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP025.H	24		8	F24:A-:B8
H	<i>E. coli</i>	HSP026.H		6	1	F-:A6:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP027.H	45		10	F45:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP028.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP029.H	64		27	F64:A-:B27
H	<i>E. coli</i>	HSP030.H	51		10	F51:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP032.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP034.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP035.H	18		8	F18:A-:B8
H	<i>E. coli</i>	HSP036.H	ND		10	ND
H	<i>E. coli</i>	HSP037.H	1	2	20	F1:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP039.H	78			F78:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP043.H	16		72	F16:A-:B72
H	<i>E. coli</i>	HSP044.H	1	2	20	F1:A2:B20/F1:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP045.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP046.H	2	1		F2:A1:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP048.H	18		1	F18:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP049.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP050.H		1	10	F-:A1:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP051.H	2		10	F2:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP053.H	51		10	F51:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP055.H	5		16	F2:A-:B16
H	<i>E. coli</i>	HSP056.H			29	F-:A-:B29
H	<i>E. coli</i>	HSP058.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP059.H	1	2	20	F1:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP061.H	1	6		F1:A6:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP062.H	1		20	F1:A-:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP065.H		1		F-:A1:B-

H	<i>E. coli</i>	HSP067.H	1	6	20	F1:A6:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP068.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HSP069.H	ND			ND
H	<i>E. coli</i>	HSP073.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HSP074.H	1	6	20	F1:A6:B20/F1:A6:B20
H	<i>E. coli</i>	HSP075.H	82			F82:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP076.H	24		73	F24:A-:B73/F24:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HSP077.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HC01.H			1	F-:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HC02.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HC03.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HC04.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HC05.H	24		1	F24:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HC07.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HVH01.H	1	2	20	F1:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HVH02.H	1	1	10	F1:A1:B10
H	<i>E. coli</i>	HVH03.H	31	4	1	F31:A4:B1
H	<i>E. coli</i>	HVH04.H	112		16	F112:A-:B16
H	<i>E. coli</i>	HVH05.H	36			F36:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH06.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH07.H		2	20	F-:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HVH08.H	2		1	F2:A-:B1/F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH11.H	2	4	1	F2:A4:B1/F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH12.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH13.H	4			F4:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH14.H			10	F-:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HVH15.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH16.H	2	1		F2:A1:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH19.H	1	2	20	F1:A2:B20
H	<i>E. coli</i>	HVH20.H	1		20	F1:A-:B20
H	<i>E. coli</i>	HVH21.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HVH23.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HVH24.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH25.H	29		10	F29:A-:B10/F29:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH26.H	2		1	F2:A-:B1
H	<i>E. coli</i>	HVH27.H	98			F98:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH29.H	2	1		F2:A1:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH30.H	29		10	F29:A-:B10
H	<i>E. coli</i>	HVH33.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH34.H	2			F2:A-:B-
H	<i>E. coli</i>	HVH37.H	1	2	20	F1:A2:B20

H	<i>E. coli</i>	HVH38.H	2	1	F2:A-:B1
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP05.H	5		K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP31.H	8		K8:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP38.H	3		K3:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSOP41.H	2		F2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP47.H	2		F2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP57.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP60.H	8		K8:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP64.H	3		K3:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP66.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP70.H	8		K8:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP71.H	2		K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP72.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP79.H	14		K14:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP81.H	9		K9:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP82.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP83.H	7		K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP85.H	2		K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP86.H	7		K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP088.H	9		K9:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP089.H	8		K8:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP090.H	8		K8:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP91.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP92.H	6		K6:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP97.H	12		K12:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP98.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP100.H	2		K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP101.H	12		K12:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HSP104.H	2		K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC08.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC11.H	9		K9:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC12.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC15.H	24		F24:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC.17.H	24		F24:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC18.H	5		K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC19.H	7		K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC22.H	10		K10:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HC24.H	1		K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH17.H	5		K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH32.H	10		K10:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH35.H	1		K1:A-:B-

H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH40.H	5			K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH42.H	17			K17:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH44.H	3			K3:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH45.H	3			K3:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH47.H	7			K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH48.H	7			K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH49.H	1	2		K1:A-:B-/F2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH50.H	1	2		K1:A-:B-/F2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH53.H	5			K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	VH59.H	2			K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH60.H		51	74	F51:A-:B74
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH62.H	4			K4:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH65.H	5			K5:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH66.H	1			K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH67.H	10			K10:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH68.H	10			K10:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH69.H	4			K4:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH71.H	7			K7:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH75.H	2			K2:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH77.H	1			K1:A-:B-
H	<i>K. pneumoniae</i>	HVH78.H	1			K1:A-:B-

*Las celdas con dos fórmulas corresponden a cepas con dos plásmidos IncF

ANEXO IV. Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

<https://doi.org/10.1128/AAC.02064-19>.



Antimicrobial Agents
and Chemotherapy®

EPIDEMIOLOGY AND SURVEILLANCE



Comparison of Commensal and Clinical Isolates for Diversity of Plasmids in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

✉ Judith Rodríguez-Navarro,^{a,b} ✉ Elisenda Miró,^a Maryury Brown-Jaque,^c Juan Carlos Hurtado,^d Albert Moreno,^{b,e}
✉ Maite Muniesa,^c ✉ Juan José González-López,^{b,e} Jordi Vila,^d ✉ Paula Espinal,^{a,*} ✉ Ferran Navarro^{a,b}

^aDepartment of Microbiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

^bGenetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^cDepartment of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^dSGlobal, Hospital Clinic—Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^eDepartment of Clinical Microbiology, Hospital Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain

Paula Espinal and Ferran Navarro contributed equally as senior authors.

ABSTRACT In this study, the plasmid content of clinical and commensal strains was analyzed and compared. The replicon profile was similar in both populations, except for L, M, A/C, and N (detected only in clinical strains) and HI1 (only in commensal strains). Although I1 and F were the most frequent replicons, only IncI1, sequence type 12 (ST12) was associated with *bla*_{CMY-2} in both populations. In contrast, the widespread resistant IncF plasmids were not linked to a single epidemic plasmid.

KEYWORDS pMLST, replicon, antimicrobial resistance, *Enterobacteriaceae*, plasmid epidemiology



UAB
Universitat
Autònoma
de Barcelona