



FACULDADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Marta Capón Saá

**CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI PATÓGENOS
EXTRAIESTINALES (ExPEC) MULTIRRESISTENTES A
LOS ANTIBIÓTICOS DE ORIGEN HUMANO**

**CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS DE CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI PATÓXENOS EXTRAIESTINAIS
(ExPEC) MULTIRRESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS DE
ORIXE HUMANA**

**CHARACTERIZATION OF PLASMIDS FROM
EXTRAIESTINAL PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*
(ExPEC) STRAINS MULTIRESISTANT TO ANTIBIOTICS
OF HUMAN ORIGIN**

Traballo Fin de Grao

06/2025

Licencia

Esta obra pertenece a Marta Capón Saá, y está bajo una licencia de “*Creative Commons* Reconocimiento 4.0 Internacional”. Para ver una copia de esta licencia, visite: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



Índice de contenidos

Resumen	8
Resumo	9
Summary	10
Resumen gráfico	11
1. Introducción.....	12
1.1 Resistencia a los antibióticos	12
1.2. Plásmidos	13
1.2.1. Conjugación	13
1.2.2. Estructura de los plásmidos	14
1.2.3. Clasificación de los plásmidos	14
1.3. Escherichia coli.....	15
1.3.1. La resistencia a antibióticos en <i>E. coli</i>	16
1.3.2. ExPEC	17
2. Hipótesis y objetivos.....	19
2.1. Hipótesis	19
2.2. Objetivos	19
3. Materiales y métodos	20
3.1. Colección de cepas.....	20
3.2. Medios de cultivo.....	20
3.3. Caracterización de las cepas.....	21
3.3.1. Fenotipo <i>lac</i>	21
3.3.2. Antibiogramas	21
3.4. Estudios de conjugación.....	23
3.4.1. Conjugación bacteriana.....	23
3.4.2. Curvas de multiplicación bacteriana	25
3.4.3. Ensayo de conjugación en diferentes condiciones	25
3.5. Estudios genotípicos	26
3.5.1. PCR.....	26
3.5.2. Puestas a punto	27
3.5.3. Caracterización y selección de cepas donadoras	27
3.5.4. Detección de plásmidos	28
3.5.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos	29
3.5.6. Detección de genes de virulencia.....	29
3.6. Estudios fenotípicos.....	29

3.6.1. Expresión de la α -hemolisina	30
3.6.2. Ensayo de movilidad	30
3.6.3. Antibiogramas	30
4. Resultados y Discusión.....	31
4.1. Caracterización de las cepas.....	31
4.1.1. Caracterización fenotípica.....	31
4.1.2. Antibiogramas y fenotipos BLEE y AmpC.....	31
4.1.3. Caracterización genotípica del perfil BLEE y ExPEC	34
4.2. Estudios de conjugación.....	35
4.2.1. Conjugación	35
4.2.2. Curva de multiplicación y conjugación en diferentes condiciones	37
4.3. Estudios genotípicos	39
4.4. Estudios fenotípicos.....	41
4.4.1. Ensayos de expresión de la α -hemolisina y de movilidad	41
4.4.2. Antibiogramas	41
5. Conclusiones	45
6. Bibliografía	46
Anexos	52

Índice de figuras

Figura 1. Resumen gráfico de “Caracterización de plásmidos de cepas de Escherichia coli patógenos extraintestinales (ExPEC) multirresistentes a los antibióticos de origen humano”. ..	11
Figura 2. Ciclos que conforman el proceso de PCR con las temperaturas y duración correspondientes.....	27
Figura 3. Sinergia en la cepa LREC_292.	34
Figura 4. Resultados de la primera conjugación.....	35
Figura 5. Fenotipo de los transconjugantes tras la segunda conjugación en agar MacConkey lactosa.....	36
Figura 6. Curva de multiplicación bacteriana resultante de la cepa LREC_292.	37
Figura 7. Curva de multiplicación bacteriana cepa K-12 MG1655.....	38
Figura 8. Resultados de la conjugación en diferentes condiciones.	39

Índice de tablas

Tabla 1. Antibióticos empleados en los antibiogramas. Puntos de corte según CLSI y EUCAST, y clasificación por familia.	22
Tabla 2. Condiciones óptimas de los primers para el cassette de resistencia al cloranfenicol cat tras la puesta a punto.	29
Tabla 3. Resultados del fenotipo lac y la morfología de las distintas cepas clínicas.	31
Tabla 4. Resultados de los antibiogramas de las 8 cepas clínicas.	33
Tabla 5. Resultados de la prueba de discos combinados para 8 cepas de E. coli ST131 procedentes de infecciones extraintestinales humanas.....	34
Tabla 6. Resultados de las PCRs de las cepas donadora, receptoras y sus transconjugantes.....	40
Tabla 7. Resultados de los antibiogramas de las cepas A82, AAG1, MG1655 y sus transconjugantes.....	42

Índice de abreviaturas

AIEC: Del inglés “*Disease-associated adherent-invasive Escherichia coli*”

AMC: Amoxicilina combinada con ácido clavulánico

AMP100: Ampicilina a 100 µg/mL

APEC: Del inglés, “*Avian pathogenic Escherichia coli*”

ATM: Aztreonam

BLEE: β-lactamasas de espectro extendido

CAZ: Ceftazidima

CAZ + CLA: Ceftazidima + ácido clavulánico

CLSI: Del inglés “*Clinical & Laboratory Standards Institute*”

CM20: Cloranfenicol a 20 µg/mL

CTX: Cefotaxima

CTX + CLA: Cefotaxima + ácido clavulánico

DAEC: Del inglés, “*Diffusely adherent Escherichia coli*”

DDST: Del inglés “*Double Disc Synergy Test*”

EAEC: Del inglés, “*Enteraggregative Escherichia coli*”

E. coli: *Escherichia coli*

EHEC: Del inglés, “*Enterohaemorrhagic Escherichia coli*”

EIEC: Del inglés, “*Enteroinvasive Escherichia coli*”

EPEC: Del inglés, “*Enteropathogenic Escherichia coli*”

ETEC: Del inglés, “*Enterotoxigenic Escherichia coli*”

EUCAST: Del inglés “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*”

ExPEC: Del inglés “*Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli*”

FEP: Cefepima

FOX: Cefoxitina

FV: Factor de virulencia

Inc: Del inglés “*Incompatibility groups*”

InPEC: Del inglés, “*Intestinal pathogenic Escherichia coli*”

LREC: Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli*

MDR: Del inglés “*Multidrug-resistant*”

MLST: Del inglés “*Multi-Locus Sequence Typing*”

NMEC: Del inglés, “*Neonatal meningitis-associated Escherichia coli*”

MOB: Relaxasa

OriT: Del inglés “*Origin of Transfer*”

O/N: Del inglés “*overnight*”

PCR: Del inglés “*Polymerase Chain Reaction*”

Rpm: Revoluciones por minuto

SEPEC: *Escherichia coli* asociada a septicemia

-TC: Transconjugante

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

UPEC: Del inglés, “*Uropathogenic Escherichia coli*”

WGS: Del inglés “*Whole Genome Sequencing*”

WHO: Del inglés “*World Health Organization*”

Resumen

El aumento progresivo de las resistencias adquiridas a antibióticos en bacterias patógenas está favoreciendo la aparición de clones multiresistentes (MDR), lo que representa una amenaza significativa para la medicina moderna. Una de las principales vías de transmisión de genes de resistencia y virulencia es la adquisición de plásmidos mediante el proceso de conjugación. Estudiar los mecanismos que intervienen en la transferencia y estabilización de estos plásmidos epidémicos se plantea como una línea estratégica clave para frenar la propagación de la multiresistencia.

En este contexto, analizamos una colección de ocho cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) pertenecientes al clon ST131 de *E. coli*—identificado como uno de los principales vectores de la diseminación mundial de BLEE—, aisladas de infecciones extraintestinales. A través de experimentos de conjugación *in vitro* y mediante la caracterización molecular y fenotípica de las cepas y sus transconjugantes.

Tras una primera caracterización, se seleccionaron siete de las ocho cepas como donadoras para los ensayos de conjugación. De estas, solo una fue capaz de transferir plásmidos conjugativos bajo las condiciones evaluadas, con frecuencias de conjugación muy bajas. La caracterización molecular y fenotípica de la cepa transconjugante permitió confirmar el papel de un plásmido IncF —multirreplicón (IncFII/IncFIB) con una relaxasa del tipo MOB12— en la fisiología de las cepas receptoras AAG1 y MG1655. Se corroboró su implicación en la transferencia de genes de virulencia asociados al patotipo UPEC. Adicionalmente, confirmamos el papel de la transferencia horizontal de genes (HGT) en la adquisición de genes de resistencia a betalactámicos. También se evaluó el efecto de este plásmido sobre la motilidad y la capacidad de producción de hemolisina de las cepas receptoras, constatando que su adquisición no alteraba estos aspectos fisiológicos.

En conclusión, este estudio logró la transferencia horizontal de un plásmido IncF, validando los análisis genotípicos previos y permitiendo evaluar su impacto en la fisiología bacteriana. Aunque se requieren investigaciones futuras para optimizar los protocolos de conjugación y favorecer la expresión de estos mecanismos en cepas ST131.

Palabras clave: *Escherichia coli*, plásmido, conjugación, ExPEC, virulencia, resistencia, antibiótico, ST131, UPEC.

Resumo

O aumento progresivo das resistencias adquiridas a antibióticos en bacterias patóxenas está favorecendo a aparición de clons multirresistentes (MDR), o que representa unha ameaza significativa para a medicina moderna. Unha das principais vías de transmisión de xenes de resistencia e virulencia é a adquisición de plásmidos mediante o proceso de conxugación. Estudiar os mecanismos que interveñen na transferencia e estabilización destes plásmidos epidémicos expónse como unha liña estratéxica clave para frear a propagación da multirresistencia.

Neste contexto, analizamos unha colección de oito cepas produtoras de β -lactamasas de espectro estendido (BLEE) pertencentes ao clon ST131 de *E. coli*—identificado como un dos principais vectores da diseminación mundial de BLEE—, illadas de infeccións extraintestinais. A través de experimentos de conxugación *in vitro* e mediante a caracterización molecular e fenotípica das cepas e os seus transconxugantes.

Tras unha primeira caracterización, seleccionáronse sete das oito cepas como doadoras para os ensaios de conxugación. Destas, só unha foi capaz de transferir plásmidos conxugativos baixo as condicións avaliadas, con frecuencias de conxugación moi baixas. A caracterización molecular e fenotípica das cepas transconxugantes permitiu confirmar o papel dun plásmido IncF—multirreplíción (IncFII/IncFIB) cunha relaxasa do tipo MOB12—na fisioloxía das cepas receptoras AAG1 y MG1655. Corroborouse a súa implicación na transferencia de xenes de virulencia asociados ao patotipo UPEC. Adicionalmente, confirmamos o papel da transferencia horizontal de xenes (HGT) na adquisición de xenes de resistencia a betalactámicos. Tamén avalíouse o efecto deste plásmido sobre a motilidade e a capacidade de produción de hemolisina das cepas receptoras, constatando que a súa adquisición non alteraba estes aspectos fisiolóxicos.

En conclusión, este estudo logrou a transferencia horizontal dun plásmido IncF, validando os análises xenotípicos previos e permitindo avaliar o seu impacto na fisioloxía bacteriana. Aínda que se requiren investigacións futuras para optimizar os protocolos de conxugación e favorecer a expresión destes mecanismos en cepas ST131.

Palabras chave: *Escherichia coli*, plásmido, conxugación, ExPEC, virulencia, resistencia, antibiótico, ST131, UPEC.

Summary

The progressive increase in acquired antibiotic resistance in pathogenic bacteria is promoting the emergence of multidrug-resistant (MDR) clones, which poses a significant threat to modern medicine. One of the main pathways for the transmission of resistance and virulence genes is the acquisition of plasmids through the process of conjugation. Studying the mechanisms involved in the transfer and stabilization of these epidemic plasmids represents a key strategic line to curb the spread of multidrug resistance.

In this context, we analyzed a collection of eight extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains belonging to the *E. coli* ST131 clone—identified as one of the main global vectors of ESBL dissemination—isolated from extraintestinal infections. We conducted *in vitro* conjugation experiments and performed molecular and phenotypic characterization of both donor strains and their transconjugants.

Following an initial characterization, seven of the eight strains were selected as donors for the conjugation assays. Of these, only one was able to transfer conjugative plasmids under the tested conditions, and the conjugation frequencies were very low. The molecular and phenotypic characterization of the resulting transconjugant strain confirmed the role of an IncF multireplicon plasmid (IncFII/IncFIB), carrying a MOB_{F12}-type relaxase, in the physiology of the recipient strains AAG1 and MG1655. Its involvement in the transfer of virulence genes associated with the UPEC pathotype was also confirmed. Additionally, we verified the role of horizontal gene transfer (HGT) in the acquisition of beta-lactam resistance genes. The effect of this plasmid on motility and hemolysin production in the recipient strains was also evaluated, showing that its acquisition did not alter these physiological traits.

In conclusion, this study successfully achieved the horizontal transfer of an IncF plasmid, validating previous genotypic analyses and enabling the evaluation of its impact on bacterial physiology. Further research is needed to optimize conjugation protocols and promote the expression of these mechanisms in ST131 strains.

Keywords: *Escherichia coli*, plasmid, conjugation, ExPEC, virulence, resistance, antibiotic, ST131, UPEC.

Resumen gráfico

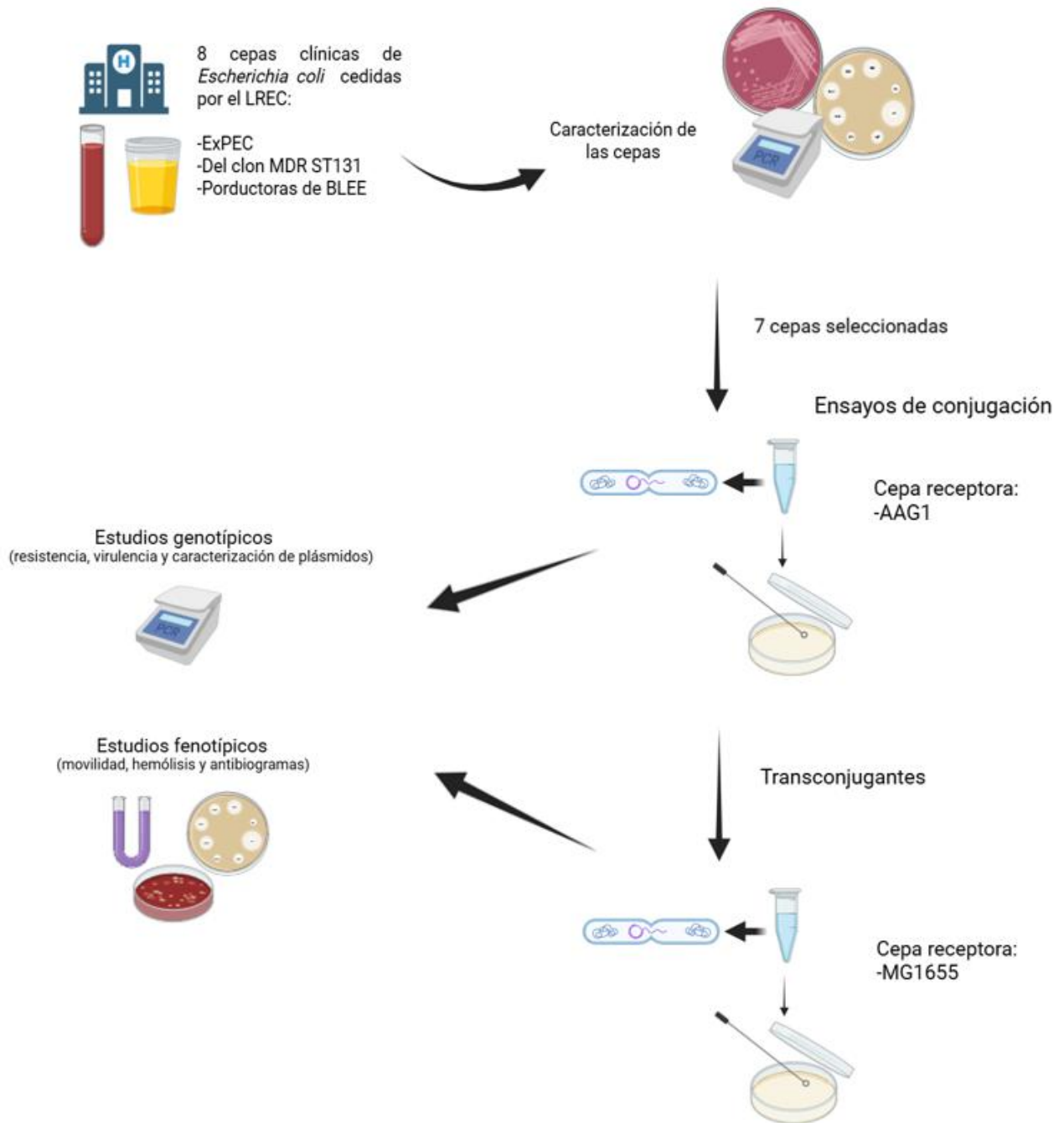


Figura 1. Resumen gráfico de “Caracterización de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) multiresistentes a los antibióticos de origen humano”.

1. Introducción

1.1 Resistencia a los antibióticos

Las enfermedades causadas por infecciones bacterianas, a pesar de la existencia de los antibióticos, siguen siendo un gran problema para la salud pública representando la segunda causa de muerte en todo el mundo. El aumento gradual de resistencias adquiridas a los antibióticos en bacterias patógenas aún agrava más la situación favoreciendo la aparición de infecciones bacterianas mortales (Morens et al., 2004). Se estima que, en el año 2019, hasta 495 millones de muertes pudieron estar asociadas con la resistencia a antibióticos (Murray et al., 2022).

Los antibióticos son un componente muy importante en la medicina moderna, ya que no solo se usan para tratar infecciones bacterianas, sino también para prevenirlas durante diferentes tratamientos o procedimientos médicos como son las cirugías o la quimioterapia. Además son cruciales para los pacientes inmunodeprimidos (Laxminarayan et al., 2016; Mathers et al., 2015).

La resistencia a los antibióticos puede transmitirse entre las bacterias mediante genes incluidos en elementos genéticos móviles, estos son: Plásmidos, islas genómicas, bacteriófagos, integrones, transposones y elementos integrativos y conjugativos. Entre ellos destacan los plásmidos como uno de los elementos más importantes en la transmisión de resistencias (Garcillán-Barcia et al., 2011; Leimbach et al., 2013; Slater et al., 2008).

La propagación de los genes de resistencia se está viendo favorecida por la presión selectiva derivada del incremento global del uso de antibióticos. Se calcula que, a nivel global, entre 2000 y 2010, el tratamiento humano con antibióticos aumentó un 35% y que el uso de los antibióticos de último recurso, carbapenémicos y polimixinas, aumentó un 45% y un 13% respectivamente (Van Boeckel et al., 2014).

Además, diversas investigaciones han documentado la aparición de combinaciones de genes de resistencia a antibióticos en un mismo plásmido, esto puede ocurrir por procesos de recombinación genética que generan plásmidos quiméricos (He et al., 2019; Xie et al., 2018). Como resultado, surgen las denominadas bacterias multirresistentes (MDR), que representan una seria preocupación clínica. La propagación y establecimiento de clones multirresistentes está contribuyendo al desarrollo progresivo de una pandemia silenciosa. Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* —una de las principales implicadas en este fenómeno— se considera multirresistente cuando presenta resistencia, al menos, a tres antibióticos pertenecientes a diferentes familias (Magiorakos et al., 2012).

A pesar de que este estudio se centra en bacterias que infectan a seres humanos, no se puede dejar de lado el concepto *One Health* (una sola salud), en el que se reconoce que la salud humana está conectada con la de los animales y el medio ambiente. La transmisión de bacterias resistentes a antibióticos además de darse entre humanos, también se puede dar de animales a humanos mediante el consumo de alimentos de origen animal o el contacto habitual con ellos, o del ambiente a los humanos, por ejemplo, al beber aguas contaminadas o ingerir vegetales que crecieron en suelo fertilizado con residuos humanos y animales (European Commission, 2017; Meek et al., 2015; Veldman et al., 2014).

Para hacer frente a este gran problema se está buscando reducir el uso de los antibióticos en todos los ámbitos, como la medicina humana y veterinaria, los procesos de limpieza y desinfección, la agricultura, etc. (Buckner et al., 2018; Carmo et al., 2017; Paitan, 2018). Y además se están tratando de desarrollar diferentes estrategias como el curado de plásmidos, que consiste en eliminar los plásmidos de las poblaciones bacterianas. Sin embargo, muy pocas de estas técnicas se han testado *in vivo* y queda mucho por avanzar (Buckner et al., 2018). Por todo ello, es

necesario seguir investigando y ganar conocimiento sobre los diferentes mecanismos de transmisión de resistencia entre bacterias, para así poder desarrollar nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de infecciones de origen bacteriano.

1.2. Plásmidos

Un plásmido consiste en una molécula de ADN extracromosómico que tienen la capacidad de replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador (Hülter et al., 2017; Mathers et al., 2015; Orlek et al., 2023; Orlek, Stoesser, et al., 2017; Rodríguez-Beltrán et al., 2021). Los plásmidos están presentes en las bacterias y se pueden transmitir entre ellas mediante la conjugación, el principal mecanismo de transferencia genética horizontal (San Millán & MacLean, 2017).

1.2.1. Conjugación

El proceso de conjugación se inicia con la unión estable de dos bacterias (la donadora, que es la que tiene el plásmido, y la receptora, que es la que lo va a adquirir) a través de un pilus conjugativo (Costa et al., 2016).

Luego tiene lugar el procesamiento del ADN plasmídico, de lo que se encarga el relaxosoma, un complejo multiproteico cuya proteína principal es la relaxasa. Esta última generalmente contiene por lo menos dos dominios conservados: un dominio transesterasa, a través del cual reconoce en una de las hebras del ADN una secuencia específica conocida como origen de transferencia (*oriT*) y corta la cadena mediante una reacción de transesterificación; y un dominio con actividad helicasa, con el que desenrolla el ADN. Los otros componentes del relaxosoma son proteínas accesorias que facilitan la unión de la relaxasa a *oriT*.

Finalmente, la relaxasa, que permanece unida a la hebra que cortó, interacciona con el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y este gran complejo proteico es el que se encarga de transportar la cadena de ADN plasmídico a la bacteria receptora a través del puente de unión. Una vez que la cadena de ADN plasmídico llega al interior de la bacteria receptora, la relaxasa se libera mediante una reacción inversa a la de transesterificación (Ilango et al., 2017) y se sintetiza la hebra que falta por replicación.

En el caso de las bacterias Gram-negativas el T4SS está compuesto por 12 componentes proteicos, nombrados desde VirB1 a VirB11 y VirD4, que son 3 ATPasas (VirB4, VirB11 y VirD4) necesarias para el funcionamiento del sistema, otras 8 proteínas que forman el complejo transmembrana y una proteína (VirB2) que se polimeriza para formar el pilus. (Costa et al., 2016).

La conjugación se debe adaptar a la fisiología de las células implicadas en el proceso, por lo que puede haber variaciones en el mecanismo dependiendo de la envoltura celular y ambiente en el que ocurre (Smillie et al., 2010). En función de la maquinaria conjugativa que codifiquen, los plásmidos pueden ser:

- Plásmidos conjugativos. Aquellos que codifican toda la maquinaria necesaria para su transmisión.
- Plásmidos movilizables. Los que codifican para la relaxasa y algunas proteínas accesorias del relaxosoma, pero ningún componente del T4SS. Estos plásmidos solo se pueden transmitir a la vez que los plásmidos conjugativos, ya que de esta forma pueden usar el T4SS que aquellos codifican.

- Plásmidos no movilizables. Son plásmidos que no se pueden transmitir por conjugación (Smillie et al., 2010), aunque algunas investigaciones señalan que lo pueden hacer por otros medios como son la transducción, la transformación o la conducción (Garcillán-Barcia et al., 2011).

1.2.2. Estructura de los plásmidos

Los plásmidos tienen una estructura modular, esto quiere decir que están formados por diferentes segmentos genéticos que codifican para una función determinada llamados módulos. Por lo que se ha visto hasta ahora, se considera que dichos módulos tienen distintos orígenes filogenéticos y que los plásmidos se han formado a partir de la combinación de estos (Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Stoesser, et al., 2017).

Una parte considerable del genoma del plásmido está constituida por módulos relacionados con su supervivencia y propagación, (módulo de replicación, módulo de estabilidad, módulo de conjugación y módulo de establecimiento) que componen la estructura principal del plásmido. Esta es una región bastante conservada entre plásmidos relacionados filogenéticamente y es por ello que se están usando secuencias de los diferentes módulos que la conforman para tratar de clasificar los plásmidos (Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Stoesser, et al., 2017).

En cambio, existen otras secuencias que codifican genes accesorios que le permiten adaptarse al hospedador, estas conforman el módulo adaptativo, se trata de secuencias que varían mucho y rápidamente. Entre los genes presentes se encuentran los de virulencia o de resistencia a antibióticos y en su propagación entre los plásmidos juegan un papel muy importante los cassettes de integrones, sobre todo en el caso de los genes de resistencias a antibióticos (Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Stoesser, et al., 2017).

1.2.3. Clasificación de los plásmidos

Existen dos sistemas principales de clasificación de plásmidos.

-En función del replicón:

Los plásmidos que codifican la misma o parecida maquinaria de replicación no se pueden transmitir a la misma célula, ya que no podrían coexistir en esta de forma estable. Es por ello que se dice que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Inc) (Nolan et al., 2015; Orlek, Stoesser, et al., 2017). En función de ello se han clasificado plásmidos de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, y de las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

En el caso de *Enterobacteriaceae* se han identificado 6 tipos comunes de replicones (IncF, HI1, HI2, I1, N y A/C). Además, se ha conseguido mediante tipificación multilocus de secuencias de plásmidos, establecer perfiles alélicos de entre 2 y 6 loci dentro de cada tipo Inc a los que se pueden asociar distintos subtipos (Orlek, Stoesser, et al., 2017).

Sin embargo, este criterio de clasificación de plásmidos tiene una gran limitación y es que un mismo plásmido puede contener múltiples replicones, lo cual dificulta el proceso (Orlek, Stoesser, et al., 2017).

-En función de la relaxasa:

Se pueden clasificar en función de las variaciones en los loci que codifican para las relaxasas, necesarias para la movilidad de los plásmidos (MOB). Se han identificado 6 familias MOB: MOBC, MOBF, MOBH, MOBP, MOBQ y MOB V (Orlek, Phan, et al., 2017; Smillie et al., 2010), dentro de las cuales mediante amplificación por PCR se pueden clasificar diferentes

subfamilias de plásmidos identificados en *Gammaproteobacteria*, uno de los grupos de bacterias más estudiado (Garcillán-Barcia et al., 2011).

Pero esta clasificación también tiene una limitación y es que a pesar de que un plásmido únicamente puede tener información genética para dar un tipo de relaxasa, no todos los plásmidos codifican para relaxasas, solo los que son movilizables o los conjugativos (Smillie et al., 2010).

Las limitaciones presentes en ambos criterios de clasificación hacen que sean complementarios y que por tanto se utilicen ambos para tratar de agrupar los plásmidos. A pesar de ello, debido a la diversidad y plasticidad de los genomas plasmídicos, estas dos propuestas de clasificación no los engloban a todos. Con lo cual, la búsqueda de genes conservados y con concordancia filogenética que permitan la clasificación de todos los plásmidos aún sigue siendo un reto a día de hoy (Orlek, Stoesser, et al., 2017).

1.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es una especie de bacteria Gram-negativa, anaeróbica facultativa y con morfología de bacilo, que pertenece al género *Echerichia* de la familia *Enterobacteriaceae* (Riley, 2020), localizada taxonómicamente en la subdivisión gamma del filo *Proteobacteria* (Leimbach et al., 2013).

El microbiólogo alemán Theodor Escherich fue el descubridor de esta bacteria. En 1885 la aisló a partir de heces infantiles y la denominó originalmente *Bacterium coli commune*, aunque después fue renombrada en honor a su descubridor (Riley, 2020).

E. coli es considerada una especie muy versátil, que se puede encontrar en muchos hábitats diferentes.

-La mayoría de las bacterias de esta especie son comensales inofensivos que forma parte de la microbiota intestinal de humanos, otros animales de sangre caliente y reptiles (Leimbach et al., 2013).

En humanos su prevalencia es de más del 90%, con una concentración por gramo de heces de entre 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colonias (Tenailon et al., 2010). Coloniza el intestino a pocas horas del nacimiento y se establece como el microorganismo anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal humana durante el resto de la vida del individuo (Leimbach et al., 2013).

-Sin embargo, *E. coli* también se describe como patógeno. Dependiendo del sitio de infección estas cepas patógenas pueden ser: *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), causante de patologías extraintestinales como infecciones del tracto urinario, bacteriemias, meningitis en recién nacidos o diversas infecciones intraabdominales, pulmonares, de la piel o tejidos blandos; o *E. coli* patógena intestinal (InPEC), causante de patologías intestinales como diarreas o el síndrome urémico hemolítico (Denamur et al., 2021; Leimbach et al., 2013).

Estos dos grupos a su vez se pueden subcategorizar en distintos patotipos o variantes patógenas. En el caso de InPEC destacan *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC). En el caso de ExPEC las más comunes son *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis (MNEC), *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC) (Leimbach et al., 2013).

Con el objetivo de poder distinguir las cepas patógenas de las comensales, se han establecido diversos sistemas de tipado, el más extendido basado en la identificación de los antígenos

somático y flagelar, que permiten clasificar a las cepas de *E. coli* en serotipos por la combinación de ambos (O:H). Existiendo combinaciones características de cepas patógenas como son O157:H7 en cepas InPEC o O25:H4 en cepas ExPEC (Nataro & Kaper, 1998; Ørskov & Ørskov, 1992). Además de esta clasificación, se han desarrollado otros sistemas de tipado basados en la identificación de variantes alélicas en genes altamente conservados, cuya combinación da lugar a las secuencias tipo (ST) según el sistema MLST (Wirth et al., 2006) o permiten establecer relaciones evolutivas entre los distintos linajes de *E. coli* permitiendo su agrupación en base a grupos filogenéticos (Clermont et al., 2000, 2013, 2019).

1.3.1. La resistencia a antibióticos en *E. coli*

E. coli se encuentra entre los patógenos considerados como “prioridad crítica” en la lista de patógenos publicada por la WHO (del inglés, *World Health Organization*), que clasifica 15 familias de bacterias resistentes a los antibióticos en función de su prioridad en tres categorías: crítica, alta y media (World Health Organization, 2024).

En la época de 1990 las cepas de *E. coli* aisladas de infecciones en humanos eran sensibles a la gran mayoría de los antibióticos. A partir del año 2000, la resistencia a antibióticos empezó a aumentar exponencialmente, en especial frente a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación (como por ejemplo cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) (Pitout et al., 2022), siendo las fluoroquinolonas unos de los antibióticos más ampliamente usados para el tratamiento de infecciones del tracto urinario (Mathers et al., 2015). Esto ha llevado a usar cada vez más antibióticos de último recurso, como los carbapenémicos, y debido a ello están apareciendo resistencias también frente a estos (Pitout et al., 2022), lo cual supone un grave problema en el área de la salud (Mathers et al., 2015).

Algunas de las resistencias a antibióticos, usados en humanos, más comunes en *E. coli* son (Poirel et al., 2018):

-Resistencia a los antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, causada por la adquisición de genes que codifican para diferentes β -lactamasas:

- β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Son un grupo de enzimas que hidrolizan y por tanto confieren resistencia a las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, el aztreonam, el cefamandol y la cefoperazona. En cambio, no afectan a las cefamicinas y los carbapenémicos. Además, los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, el sublactam o el tazobactam, son capaces de inhibirlas. Las BLEE son más de 300 enzimas que se pueden agrupar en tres familias principales: TEM, conformada por más de 160 miembros; SHV, con más de 110 enzimas; y CTX-M, constituida por más de 80 miembros.
- β -lactamasas pAmpC. Son otro grupo enzimático cuyos sustratos son las penicilinas, las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, las cefamicinas y el aztreonam. Sin embargo, no confieren resistencia frente a las cefalosporinas de cuarta generación ni a los carbapenémicos y no son inhibidas por el ácido clavulánico (Paitan, 2018). Las principales familias enzimáticas que conforman este grupo son: CMY, DHA y ACC, con una mayor prevalencia de las enzimas CMY a nivel mundial (Poirel et al., 2018).
- Carbapenemasas. Los carbapenémicos son medicamentos de último recurso se usan para tratar infecciones severas causadas por bacterias productoras de BLEE o de pAmpC. Pero la aparición de estas bacterias ha causado que se usen más los carbapenémicos y con ello un aumento de la resistencia a estos. Dicha resistencia se da por la producción de las enzimas carbapenemasas. Las variantes más comunes de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* en general, son: KPC, NDM, OXA-48, IMP y VIM (Paitan, 2018).

-Resistencia a las quinolonas y fluoroquinolonas, esta se puede adquirir de varias formas:

- Mutaciones en los genes de la bacteria que codifican para una de las subunidades que conforma la girasa, *gyrA*, y una de las subunidades que conforman la topoisomerasa IV, *parC*. Ambas enzimas mencionadas son dianas de dichos antibióticos, es por ello que mutaciones en sus subunidades confieren resistencia frente a estos. En el caso de las quinolonas sirve con que haya mutaciones individuales en el gen *gyrA*, en cambio, para las fluoroquinolonas es necesaria la presencia de más mutaciones, ya sean en el gen *gyrA*, *parC*, o en ambos.
- Mediante la transmisión de plásmidos que codifican para mecanismos de resistencia frente a estos antibióticos como las proteínas Qnr, la AAC(6')-Ib-cr acetiltransferasa o las bombas de expulsión activa QepA y OqxAB.

-Resistencia a los aminoglucósidos. Esta se puede adquirir por:

- La aparición de mutaciones en el ARN ribosomal 16S y/o en las proteínas ribosomales S5 y S12.
- La adquisición de genes que codifican para tres tipos de enzimas que modifican los aminoglucósidos: Aminoglucósido acetiltransferasas, aminoglucósido nucleotidiltransferasas y aminoglucósido fosfotransferasas.

-Resistencia a las sulfonamidas y a la trimetoprima, que se presenta por:

- Mutaciones en las enzimas diana de estos antibióticos, la dihidropteroato sintasa (en el caso de las sulfonamidas) y la dihidrofolato reductasa (en el caso de la trimetoprima).
- La adquisición de plásmidos con alguno de los genes *sul*, que codifican para dihidropteroato sintasas que no detectan las sulfonamidas; o alguno de los genes *dfr*, que codifican para dihidrofolato reductasas indetectables por la trimetoprima.

Además, también se han observado en *E. coli* genes que codifican para resistencia frente a antibióticos de uso veterinario como: fosfomicina, tetraciclinas y fenicoles (Poirel et al., 2018).

1.3.2. ExPEC

La *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) es la mayor causa de infecciones en el tracto urinario y la bacteria Gram-negativa más comúnmente asociada con infecciones sanguíneas a nivel mundial (Pitout, 2012).

A diferencia de las cepas InPEC, que se pueden diferenciar de las cepas comensales, las cepas ExPEC no se distinguen tan fácilmente. Es por ello que no está clara la procedencia de las cepas ExPEC. Se baraja si se puede tratar de cepas comensales que rompen la barrera estéril que separa el intestino del resto del cuerpo y dan lugar a las infecciones extraintestinales al colonizar nuevos lugares del organismo (Riley, 2020).

La presencia de factores de virulencia en las cepas ExPEC les confiere la capacidad de establecerse y sobrevivir en los epitelios extraintestinales y por tanto causar infecciones. Estos factores están implicados en: la adhesión, evasión del sistema inmune, producción de toxinas, captación de hierro y formación de la cápsula bacteriana (Denamur et al., 2021; Li et al., 2023; Pitout, 2012; Shin & Ko, 2015; Wang et al., 2022).

Las cepas ExPEC incluyen diferentes clones, asignados a distintas secuencias tipo (ST), entre los cuales solo unos cuantos son la causa global de muchas de las infecciones extraintestinales, destacando el clon ST131 (Li et al., 2023).

-ST131

El clon de *E. coli* ST131 es el de mayor riesgo en lo referente a la propagación de multirresistencia a los antibióticos (Pitout et al., 2022), destacando la resistencia a las fluoroquinolonas y a los β -lactámicos por producción de BLEEs (Cave et al., 2023). Fue el principal responsable del aumento global de la resistencia a las fluoroquinolonas y las cefalosporinas en *E. coli* durante los años 2000 (Pitout et al., 2022) y es el mayor causante de infecciones del tracto urinario a nivel mundial (Cave et al., 2023). Los tres clados, A, B y C, explican su evolución:

El clado inicial es el A, al que pertenecen las cepas ST131 con el alelo *fimH41* (Pitout et al., 2022) del gen de adhesina fimbrial tipo 1 *fimH* (Weissman et al., 2006).

Alrededor de 1950, un proceso de recombinación en el gen *fimH* dio lugar a la aparición del clado B, el cual se caracteriza por la presencia del alelo *fimH22* (Cave et al., 2023; Denamur et al., 2021; Pitout et al., 2022).

Y sobre el año 1987 apareció el clado C (Denamur et al., 2021; Pitout et al., 2022), que es el linaje más prevalente (Mathers et al., 2015) y se caracteriza por la presencia del alelo *fimH30* y la resistencia a la fluoroquinolona, resultado de mutaciones en *parC* y *gyrA*. Este a su vez se dividió en tres subclados: C0, también conocido como *H30*, en el cual aún están incluidas cepas sensibles a la fluoroquinolona; C1, también conocido como *H30R*, que se caracteriza por portar el gen *blaCTX-M-14* (Cave et al., 2023; Denamur et al., 2021; Pitout et al., 2022), aunque ahora están aumentando dentro de este subclado las cepas portadoras de *blaCTX-M-27*, lo que dio lugar al grupo C1-M-27 (Pitout & DeVinney, 2017); y C2, también conocido como *H30Rx*, que se caracteriza por codificar el gen *blaCTX-M-15* (Cave et al., 2023; Denamur et al., 2021; Pitout et al., 2022).

El transporte de el gen *blaCTX-M* típico de las cepas ST131 del clado C está generalmente asociado con los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad F (IncF) (Cave et al., 2023). Otros plásmidos típicos de la ST131 son los IncI1, IncN e IncA/C, siendo los IncI1 también comunes en el transporte de genes BLEE en cepas ExPEC (Decano et al., 2021).

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

La hipótesis que sustenta este estudio propone que la adquisición, mediante conjugación bacteriana, de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos y/o factores de virulencia por parte de cepas comensales de *E. coli* puede inducir alteraciones significativas en su fisiología. Entre los efectos esperados se incluyen: un aumento en la resistencia a distintos antimicrobianos, la capacidad de producir toxinas como la hemolisina y una posible modificación de su motilidad.

2.2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es profundizar en el conocimiento de los mecanismos de transferencia horizontal de genes mediante conjugación bacteriana, centrados en la adquisición de determinantes de resistencia antimicrobiana y virulencia. Para ello, se emplearán aislamientos clínicos humanos de *E. coli* pertenecientes al clon multirresistente ST131 (MDR). Además, se evaluará el impacto que la adquisición de plásmidos específicos puede ejercer sobre la fisiología de cepas receptoras comensales (transconjugantes).

Objetivos específicos:

1. Seleccionar cepas donadoras portadoras de plásmidos con determinantes de resistencia a antibióticos y/o factores de virulencia, a partir de aislamientos clínicos humanos de *E. coli* ST131.
2. Establecer las condiciones óptimas para la conjugación bacteriana *in vitro*.
3. Caracterizar genotípicamente los plásmidos implicados en la transferencia, incluyendo la detección de genes de resistencia y virulencia en las cepas donadoras y transconjugantes.
4. Evaluar fenotípicamente el impacto fisiológico de la adquisición plasmídica en las cepas transconjugantes, analizando la resistencia a antibióticos, la motilidad y la producción de hemolisina.

3. Materiales y métodos

3.1. Colección de cepas

Se ha trabajado con:

-Ocho cepas de *E. coli* aisladas de infecciones extraintestinales en seres humanos—seis procedentes de infecciones urinarias (LREC_264, LREC_274, LREC_275, LREC_278, LREC_287 y LREC_292), una procedente de una infección ósea y otra de bacteriemia (LREC_288 y LREC_289, respectivamente) — de las cuales contábamos con la secuenciación del genoma completo con tecnología de segunda generación y una reconstrucción presuntiva de su plasmidoma (Flament Simon, 2021).

Se trata de una colección de cepas ExPEC pertenecientes al clon de alto riesgo ST131 multirresistentes a antibióticos y productoras de BLEE. Proceden del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela.

-Dos cepas que serán las receptoras en los estudios de conjugación bacteriana:

- MG1655, que es una cepa comensal modelo de *E. coli*, también conocida como K-12 (Guyer et al., 1981).
- AAG1, que es un mutante de MG1655 con mutaciones en el operón *lac* ($\Delta lacZ$) y un truncamiento del gen *fliC* interrumpido por un *cassette* de cloranfenicol (*fliC:cat*) (Åberg et al., 2008).

Ambas cepas fueron cedidas para este trabajo por el grupo de investigación de Biología molecular de bacterias patógenas y estrategias antimicrobianas de la Universidad de Barcelona.

3.2. Medios de cultivo

Los distintos estudios desarrollados en este trabajo se llevaron a cabo utilizando varios medios de cultivo:

-Agar triptona de soja (TSA) (AppliChem-Panreac).

-Agar MacConkey lactosa (ML) (Oxoid).

-Agar Mueller-Hinton (distribuir 20 mL por placa) (MH) (Oxoid).

-Caldo triptona de soja (TSB) (repartir en tubos de ensayo, 5 mL por tubo) (AppliChem-Panreac).

-Solución Ringer isotónica (Scharlau).

-Luria-Bertani broth (LB caldo). Para su preparación se necesita NaCl (10g/L) (Labkem), triptona (10g/L) (Condalab) y extracto de levadura (5g/L) (Condalab).

-LB agar. Para su preparación se necesita NaCl (10g/L) (Labkem), triptona (10g/L) (Condalab), extracto de levadura (5g/L) (Condalab) y agar (15g/L) (Condalab).

-Medio Agar Sangre (comercial preparado).

-Medio MIL (Motility Indole Lysine Medium) (Difco™).

-Medio Mínimo con Sales M9 y glucosa (MM9). Está compuesto por las soluciones base de sales M9 5X, CaCl₂ 1M y MgSO₄ 1M esterilizadas mediante autoclave, y las soluciones de glucosa al 20% y tiamina al 0,5% filtradas, añadidas todas ellas a una solución autoclavada de agar en agua destilada (en el caso de preparar medio líquido omitir el agar).

-Medio de conservación (distribuido en tubos Vacutainer™, 5 mL por tubo). Se obtiene disolviendo en agua destilada agar nutritivo (11,5 g/L) (AppliChem-Panreac) y caldo nutritivo (4 g/L) (AppliChem-Panreac). En estas condiciones las cepas de *E. coli* pueden mantenerse viables durante 10 años a temperatura ambiente.

Algunos medios de cultivo se suplementaron con antibióticos, en concreto empleamos: Ampicilina y cloranfenicol, se han usado para introducirlos en los medios de cultivo cuando era necesario, a concentraciones de 100 y 20 µg/mL respectivamente.

3.3. Caracterización de las cepas

3.3.1. Fenotipo *lac*

Con el objetivo de conseguir colonias aisladas y observar su capacidad de metabolizar lactosa (fenotipo *lac*, relacionado con la funcionalidad del operón *lac*), se sembraron las 8 posibles cepas donadoras en agar MacConkey lactosa por agotamiento de estrías y se dejaron crecer a 37°C *overnight* (O/N). Además, se hizo una copia de trabajo en medio de conservación para cada una de estas 8 cepas.

3.3.2. Antibiogramas

Con el objetivo de determinar el perfil de resistencia a los antibióticos. Se llevaron a cabo antibiogramas mediante la técnica de difusión de discos en agar, siguiendo el protocolo propuesto por 1980 Barry et al. (1980) con ligeras adaptaciones:

Con ayuda de un asa de siembra estéril y partir de un cultivo puro, se recupera una pequeña cantidad de bacteria y se inocula en 5 mL de TSB. Posteriormente ajustamos la concentración en base al tubo con 0,5 de turbidez en la Escala de McFarland (lo que equivale aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Seguidamente, se humedece un hisopo estéril en el cultivo ajustado, se realiza una siembra en césped sobre placas Petri con agar Mueller-Hinton y se deja que el medio absorba el inóculo durante un tiempo mínimo de 5 minutos y máximo de 15. Trascurrido este tiempo, se colocan los discos con los antibióticos pertenecientes a distintas familias que se muestra en la **Tabla 1**. Se reparten 6 discos por placa y a una distancia de mínimo 2,5 cm. Se espera a que difunda el antibiótico a temperatura ambiente entre 5 y 15 minutos y después se deja la placa en la incubadora a 37°C durante 18 horas.

Tabla 1. Antibióticos empleados en los antibiogramas. Puntos de corte según CLSI y EUCAST, y clasificación por familia.

Antimicrobiano	Disco	CLSI-2025 (diámetro halo mm)			EUCAST-2025 (diámetro halo mm)		Familia
		R	I	S	S	R	
Amoxicilina-Clavulánico	AMC30	≤13	14-17	≥18	≥19	<19	Penicilina
Ampicilina	AM10	≤13	14-16	≥17	≥14	<14	Penicilina
Cefazolina parenteral y oral	CZ30	≤19 ≤14	20-22 -	≥23 ≥15	-	-	Cefalosporina 1ª generación
Cefuroxima-parenteral Cefuroxima-oral	CXM30	≤14 ≤14	15-17 15-22	≥18 ≥23	≥18	<18	Cefalosporina 2ª generación
Cefoxitina	FOX30	≤14	15-17	≥18	≥19	<19	Cefalosporina 2ª generación
Ceftazidima	CAZ30	≤17	18-20	≥21	≥22	<19	Cefalosporina 3ª generación
Ceftriaxona	CRO30	≤19	20-22	≥23	≥23	<20	Cefalosporina 3ª generación
Imipenem	IMP10	≤19	20-22	≥23	≥22	<19	Carbapenémicos (betalactámico)
Aztreonam	ATM30	≤17	18-20	≥21	≥26	<21	Monobactámico
Ac. Nalidíxico	NAL30	≤13	14-18	≥19	NA	NA	Fluoroquinolas
Ciprofloxacina	CIP5	≤21	22-25	≥26	≥25	<22	Fluoroquinolas
Amikacina	AN30	≤16	17-19	≥20	≥18	<18	Aminoglucósidos
Gentamicina	GM10	≤14	15-17	≥18	≥17	<17	Aminoglucósidos
Cotrimoxazol	SXT25	≤10	11-15	≥16	≥14	<11	Agente misceláneo
Doxiciclina	D30	≤10	11-13	≥14	-	-	Tetraciclinas
Tetraciclina	TE30	≤11	12-14	≥15	≥19	-	Tetraciclinas
Cloranfenicol	C30	≤12	13-17	≥18	≥17	<17	Fenicoles

La tabla muestra los antibióticos utilizados en las pruebas de sensibilidad, con sus correspondientes denominaciones en los discos de difusión, los diámetros de halo (en mm) interpretados como sensibilidad (S) o resistencia (R) según los criterios del CLSI (del inglés, Clinical & Laboratory Standards Institute) y EUCAST (del inglés, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vigentes, y la familia farmacológica a la que pertenece cada antimicrobiano.

-Prueba de sinergia de doble disco

La prueba de sinergia de doble disco (*Double Disc Synergy Test*, DDST) descrita por Jarlier et al. (1988), fue el primer método propuesto para la detección de cepas productoras de BLEE en *Enterobacteriaceae*. Se basa en la capacidad del ácido clavulánico de inhibir las BLEE, por lo que se emplea para la detección de cepas productoras de BLEE y además también puede servir para las que producen β-lactamasas AmpC.

Esta prueba repite el mismo procedimiento de técnica de difusión en agar explicado anteriormente, pero en este caso, se coloca en el centro de la placa un disco de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC, antibiótico combinado con un inhibidor de betalactamasas) y a su alrededor, separados 3 cm medidos desde los centros, se distribuyen cuatro discos: De cefotaxima (CTX, cefalosporina de tercera generación), ceftazidima (CAZ, cefalosporina de tercera generación), aztreonam (ATM, monobactámico) y cefepima (FEP, cefalosporina de cuarta

generación), que son antibióticos que las BLEE son capaces de hidrolizar. Un resultado positivo para BLEE se manifiesta por la aparición de halos de inhibición en forma de “corcho de botella” u “ojo de cerradura”, lo que indica un efecto de sinergia entre el ácido clavulánico (inhibidor en el disco central) y los antibióticos β -lactámicos adyacentes, que carecen de inhibidor.

-Prueba de discos combinados con inhibidor

Este método se basa en el estudio de la sensibilidad frente a la cefotaxima y la ceftazidima en presencia o ausencia del ácido clavulánico (CLA, inhibidor de betalactamasas), en función de ello se determina si son cepas productoras de BLEE o incluso también puede sugerir si son productoras de β -lactamasas AmpC.

En este caso, al igual que en la prueba de sinergia de doble disco, se repite el procedimiento de técnica de difusión en agar pero variando los discos y su distribución: En el centro un disco de cefoxitina (FOX, grupo de las cefamicinas y marcador diferencial entre BLEE y AmpC) y en torno a este, un disco de cefotaxima sola (CTX) y otro con cefotaxima más ácido clavulánico (CTX+CLA), y un disco de ceftazidima sola (CAZ) y otro con ceftazidima más ácido clavulánico (CAZ+CLA). Un resultado positivo para BLEE se interpreta cuando se observa un aumento ≥ 5 mm en el halo de inhibición de los discos combinados (CTX+CLA o CAZ+CLA) en comparación con los discos que contienen los antibióticos sin inhibidor (CTX o CAZ). Esto indica sinergia y, por tanto, presencia de BLEE sensibles a CLA.

3.4. Estudios de conjugación

3.4.1. Conjugación bacteriana

Se realizaron dos conjugaciones:

-Primera conjugación:

- Cepas donadoras: De las 8 cepas donadoras iniciales, en función de los resultados del antibiograma se seleccionaron como cepas donadoras aquellas que eran sensibles al cloranfenicol y resistentes a la ampicilina.
- Cepa receptora: La cepa AAG1, que es lactosa negativa, carente de plásmidos y con resistencia cromosómica al cloranfenicol.

Procedimiento:

Las cepas donadoras y receptora se inoculan en diferentes tubos Falcon estériles (uno por cepa, exceptuando la receptora que se prepararán dos tubos porque se va a usar más cantidad) con 3 mL de LB caldo y el antibiótico necesario que, en el caso de las donadoras será ampicilina a 100 μ g/mL (AMP100) y en el caso de la receptora, cloranfenicol a 20 μ g/mL (CM20). Después, se dejan crecer estos cultivos en la incubadora a 37°C O/N.

Al día siguiente, se centrifugan a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante, se hace un lavado con 3 mL de LB caldo sin antibiótico y se resuspende el *pellet* en este medio. A continuación, se describen las distintas suspensiones bacterianas, preparadas en microtubos con un volumen final de 500 μ L, para estudiar la conjugación bacteriana transcurridas 4 horas de incubación a 37°C:

- Microtubos de conjugación: Se mezclan 350 μ L de la cepa receptora con 150 μ L de una cepa donadora. A partir de este (cumplidas 4 horas de incubación) se harán dos diluciones seriadas en Solución Ringer (1:10 y 1:100) y se sembrarán, con ayuda de las perlas de vidrio autoclavadas, 100 μ L de cada solución obtenida, incluyendo la solución madre

(siembra directa), en una placa con LB agar AMP100 + CM20, las cuales se pondrán a incubar a 37°C O/N. Es en estas placas donde se observará si hay crecimiento de transconjugantes, cepas receptoras que adquirieron uno o varios plásmidos de las donadoras mediante conjugación.

- Microtubo para control negativo de la receptora: Se mezclan 350 µL de la cepa receptora y 150 µL de LB caldo sin antibiótico. Pasadas las 4 horas de incubación se sembrarán, con ayuda de las perlas de vidrio autoclavadas, 100 µL de la solución del microtubo en una placa con LB agar AMP100 y se pondrá a incubar a 37°C O/N, si todo está en orden no debería crecer nada.
- Microtubos para controles negativos de las donadoras: Se mezclan 350 µL de LB caldo sin antibiótico con 150 µL de la cepa donadora. Tras las 4 horas de incubación se sembrarán, con ayuda de las perlas de vidrio autoclavadas, 100 µL de la solución de los microtubos en placas con LB agar CM20 y se incubarán a 37°C O/N, si todo está en orden no debería haber crecimiento en ninguna de las placas.

Finalmente, es necesario confirmar que las cepas obtenidas como resultado del proceso de conjugación son realmente transconjugantes. Para ello se sembraron 3 colonias de cada posible transconjugante en LB agar AMP100 + CM20 y en agar MacConkey lactosa. Confirmamos que se cumplían las siguientes condiciones: crecimiento en medio LB AMP100 + CM20 y en medio agar MacConkey lactosa mostraban ser lactosa negativas. Con ello confirmamos que conservaban las características de la cepa receptora al ser resistentes al cloranfenicol y lactosa negativas, pero también constatamos resistencia a la ampicilina, lo cual es un marcador de la presencia de posibles plásmidos adquiridos por conjugación.

-Segunda conjugación:

Con el objetivo de poder realizar estudios de fisiología bacteriana y ver cómo influye la presencia de plásmidos adquiridos por conjugación en diferentes procesos celulares, se debe hacer una segunda conjugación donde la cepa receptora sea una cepa comensal de *E. coli* sin mutaciones, la MG1655.

- Cepas donadoras: Las transconjugantes obtenidas de la conjugación anterior.
- Cepa receptora: La cepa MG1655, que es una cepa modelo de *E. coli* comensal, lactosa positiva, que no presenta ningún tipo de resistencia adquirida a los antibióticos.

El procedimiento es muy similar al de la conjugación anterior, pero hay que tener en cuenta las características de la nueva receptora, por tanto:

- La nueva cepa receptora se inoculará en 3 mL de LB sin antibióticos.
- Los 100 µL de todas las soluciones y diluciones seriadas se sembrarán en placas con agar MacConkey lactosa AMP100. De esta forma los transconjugantes deberán crecer (signo de que se transfirió el plásmido con la resistencia a la ampicilina) y mostrar un fenotipo lactosa positivo, característico de la receptora; la receptora no crecerá al no ser resistente a la ampicilina y las donadoras crecerán pero mostrarán un fenotipo lactosa negativo, característico de estas al ser las transconjugantes de la conjugación anterior.

Una vez obtenidos, los transconjugantes de ambas conjugaciones se siembran por picadura en medio de conservación AMP100 + CM20, en el caso de los transconjugantes de la primera conjugación, o en medio de conservación AMP100, en el caso de los de la segunda. También se les hará una copia para su conservación a -20°C (500 µL del cultivo en LB caldo + 500 µL de glicerol al 20%).

3.4.2. Curvas de multiplicación bacteriana

También son conocidas como curvas de crecimiento bacteriano, refiriéndonos con el término de crecimiento bacteriano al incremento en el número de células.

Se realizó la curva de multiplicación bacteriana a partir de la bacteria donadora que conjugó con la receptora AAG1 en la primera conjugación, para ello se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Primero se inoculan las bacterias en un tubo Falcon con 3 mL de LB caldo AMP100 y se dejan incubando a 37°C O/N.

Al día siguiente, se resuspenden 100 µL del cultivo O/N en 20 mL de LB caldo contenidos dentro de un Erlenmeyer estéril y se ponen a incubar a 37°C en agitación. Cada hora, durante 8 horas, se toma 1 mL de dicho cultivo del que se reparten 900 µL a una cubeta de espectrofotómetro para medir la densidad óptica a 600 nm y con los 100 µL restantes se hacen diluciones seriadas en Solución Ringer hasta llegar a la dilución 10. Partiendo de las diluciones seriadas sembramos 100µL con ayuda de perlas de vidrio autoclavadas en placas de LB AMP100. Cumplida la incubación a 37°C O/N, determinamos el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) mediante el recuento de colonias crecidas y aplicando la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen de muestra sembrada (mL)}}$$

Finalmente, representando el logaritmo en base 10 de las UFC/mL frente al tiempo en horas se obtiene la curva de multiplicación bacteriana.

3.4.3. Ensayo de conjugación en diferentes condiciones

En este caso se repite el protocolo de conjugación en dos fases del crecimiento bacteriano (exponencial y estacionaria) y en dos medios diferentes (LB y medio mínimo), para estudiar cómo es la conjugación en función del momento del crecimiento en el que se encuentren las bacterias y de la disponibilidad de nutrientes en el medio, ya que el medio mínimo solo contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento bacteriano, a diferencia del LB agar que es más rico en nutrientes.

Lo primero que se hace, al igual que en el procedimiento anterior, es inocular las bacterias en un tubo Falcon con 3 mL de LB caldo AMP100 y se dejan incubando a 37°C O/N. Al día siguiente, resuspender 100 µL del cultivo en 20 mL de LB caldo en un matraz Erlenmeyer estéril y ponerlo a incubar a 37°C en agitación. Pero en este caso también se va a hacer lo mismo con la cepa receptora AAG1 solo que sin la ampicilina en el LB caldo para cultivar O/N.

En la curva de multiplicación bacteriana obtenida se mira cuántas horas necesita la cepa donadora para alcanzar la fase exponencial y cuántas para la fase estacionaria.

Transcurrido el tiempo que requieren las bacterias para alcanzar la fase exponencial desde que se pusieron a incubar en agitación, se pasan 3 mL del cultivo a un tubo Falcon y se inicia el protocolo de conjugación desde la centrifugación, se deber realizar por duplicado ya que además de usar LB, también hay que hacerlo con medio mínimo. A su vez, esto todo se repite cuando llega la cepa a su fase de crecimiento estacionaria.

El protocolo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

3.5. Estudios genotípicos

3.5.1. PCR

Nuestro protocolo de PCR incluye los siguientes pasos:

- Preparación de los *primers*

En primer lugar, los *primers* fueron hidratados a concentración de almacenamiento (100 μ M). Con este fin, se considerarán los nmoles indicados por la casa comercial en el certificado de análisis o en la etiqueta del tubo de cada *primer* recibido, para calcular el volumen del tampón de reconstitución 1 mM Tris-HCl/0'01 mM EDTA (pH8) que se deberá añadir para hidratarlos a la concentración de 100 μ M. A partir de la solución anterior, se prepararán alícuotas de trabajo de 500 μ L a concentración 10 μ M, diluyendo también en tampón de reconstitución. En ambos casos es importante homogeneizar bien las soluciones al inicio y final del proceso.

- Extracción del ADN

Con un asa de siembra calibrada de 1 μ l estéril se recupera una pequeña cantidad del cultivo de bacterias en placa y se resuspenden en un microtubo con 600 μ L de agua Milli-Q previamente esterilizada en el autoclave. Se calentará durante 5 minutos a 100°C y posteriormente se centrifugará a 11.000 rpm durante 2 minutos. De esta forma el ADN de las bacterias quedará en el sobrenadante.

- Preparación de la mezcla de PCR

En cada mezcla de PCR hay que añadir agua Milli-Q, el reactivo NZYtechTaq 2x Green Master Mix (solución que incluye los dNTPs y la Taq polimerasa), los *primers* correspondientes al gen o genes que se quieren amplificar y en último lugar el ADN molde.

Antes de ponerse a preparar las mezclas es importante hacer todos los cálculos de las cantidades que hay que añadir de cada componente. Para este protocolo utilizaremos volúmenes constantes de Mix (12,5 μ L) y ADN (5 μ L), por lo que teniendo en cuenta que en cada tubo de PCR debe haber un volumen final de 25 μ L, será necesario ajustar la cantidad de agua Milli-Q y de *primers* a utilizar. La concentración empleada y temperatura de anillamiento específica de cada primer se encuentran en **Anexos**.

Se añadieron controles positivos y negativos de forma sistemática. Las cepas control utilizadas en este trabajo fueron cedidas por el LREC.

- Amplificación en el termociclador (reacción de PCR)

Para este proceso los tubos con sus correspondientes mezclas y ADN se introducen en el termociclador, donde serán sometidas a distintos ciclos de temperaturas para que tenga lugar la reacción de PCR como se muestra en la **Figura 2**.

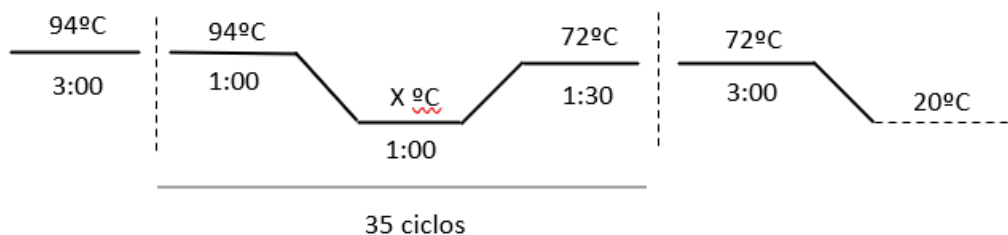


Figura 2. Ciclos que conforman el proceso de PCR con las temperaturas y duración correspondientes.

Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos de en los que tiene lugar primero una fase de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, luego de hibridación de los primers con el ADN a la temperatura específica (temperatura de anillamiento) durante 1 minuto y finalmente de extensión a 72°C durante 1 minuto y 30 segundos; y por último, un ciclo final de extensión a 72°C durante 3 minutos. Una vez terminado el proceso de amplificación, los amplicones (fragmentos de ADN amplificados por PCR) se mantienen a 20°C de manera indefinida.

- Lectura de resultados

Para ello es necesario hacer una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x (Tris 1,6M, acetato sódico 0,8M y EDTA 0,025M), añadiendo al final 3 µL de Green Safe Premium (Nzytech) por cada 100 mL preparados y dejando solidificar el gel en un molde.

Luego, se coloca este gel en la cubeta de electroforesis, se cargan 7 µL de amplificado por pocillo, se conecta durante un tiempo determinado a una corriente de amperaje y voltaje adecuados (400mA/120V), y finalmente se leen los resultados.

3.5.2. Puestas a punto

Para utilizar los *primers* de manera eficiente en las reacciones de PCR con el ADN de las cepas en estudio, es fundamental determinar las condiciones óptimas de temperatura y concentración a las que estos anillan correctamente. Por este motivo, se realizaron puestas a punto, que consisten en llevar a cabo el protocolo de PCR previamente descrito, pero variando la temperatura de anillamiento (45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C) y la concentración del *primer* en la reacción con el objetivo de identificar las condiciones que generan bandas más nítidas y aparición de menos inespecificidades en el gel de agarosa.

3.5.3. Caracterización y selección de cepas donadoras

Tras realizar varios reisolamientos, fue necesario caracterizar en detalle las cepas clínicas seleccionadas para este estudio. Además, se llevó a cabo una caracterización molecular de toda la colección de cepas potencialmente donadoras. Las cepas incluidas en este trabajo, como se mencionó previamente, provienen de infecciones humanas extraintestinales y, por tanto, pertenecen al patotipo ExPEC (*E. coli* patógeno extraintestinal).

Este patotipo se asocia con la presencia de determinados factores de virulencia (FV), y por ello se emplean genes específicos como marcadores para la identificación presuntiva del estatus ExPEC, incluso en cepas aisladas de fuentes no clínicas (como alimentos o muestras fecales). Esta identificación, basada en marcadores genéticos, permite predecir el potencial patogénico extraintestinal de cualquier cepa de *E. coli*.

Los genes de virulencia analizados en este estudio incluyen:

-Genes que codifican adhesinas:

- *papC* y *papEF*, integrantes del operón *pap*, que codifica las fimbrias P, responsables de la adhesión a receptores del tracto urinario superior y asociadas a nefritis (J. R. Johnson et al., 2015; Li et al., 2023; Yamamoto et al., 1995).
- *sfa/focDE*, relacionados con la fimbria S (operón *sfa*) y la fimbria F1C (genes *foc*) (Mulvey, 2002).
- *afa/draBC*, forman parte de los operones *afa* y *dra*, que junto con el operón *daa*, codifican fimbrias de la familia Dr/Afa (Servin, 2005, 2014).

-Genes implicados en la captación de hierro del medio como *iutA*, gen que codifica para un receptor de aerobactina férrica (J. R. Johnson et al., 2003; Wang et al., 2022).

-El gen *kpsM II*, implicado en la biosíntesis de la cápsula bacteriana (Dahbi et al., 2014; Shin & Ko, 2015).

Actualmente, se considera que una cepa posee estatus ExPEC si presenta al menos dos de los siguientes cinco marcadores: *papAH* y/o *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II* (J. R. Johnson et al., 2015).

Por otra parte, para ser clasificada como UPEC (uropatógeno), debe contener al menos tres de los siguientes cuatro genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y *yfcV* (Spurbeck et al., 2012).

En el caso de cepas APEC (patógeno aviar), se requiere la presencia de cuatro de cinco marcadores: *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* y *ompT* (T. J. Johnson et al., 2008).

Adicionalmente, se realizó la detección por PCR de genes de resistencia β -lactámica, específicamente aquellos asociados al fenotipo BLEE, ya que esta es una de las características clave de las cepas seleccionadas. Esta verificación molecular permitió confirmar la presencia de los genes de interés, asegurando que no se hayan perdido durante los reaslamientos o el almacenamiento en medios no selectivos, en los cuales los plásmidos podrían haberse eliminado por falta de presión selectiva.

Se seleccionaron tres genes marcadores representativos de dos de las principales familias de BLEE descritas en la introducción:

- *blaCTX-M*-grupo 9 y *blaCTX-M*-grupo 1, codificantes de BLEEs del grupo CTX-M.
- *blaSHV*, codificante de una BLEE perteneciente a la familia SHV.

Los *primers* empleados y las condiciones específicas de trabajo se muestran en **Anexos**.

3.5.4. Detección de plásmidos

La detección de los plásmidos se hizo para las cepas donadoras, receptoras y las transconjugantes obtenidas en los dos procesos de conjugación.

Para ello se seleccionaron *primers* que amplificasen genes codificantes de replicones y relaxasas, los cuales son característicos de los plásmidos que se pueden transmitir por conjugación y están implicados en las clasificaciones Inc y MOB. En concreto se eligieron los enumerados a continuación:

-IncFII, IncFIA e IncFIB, replicones característicos de plásmidos pertenecientes a la familia IncF, que son muy típicos de clones concretos de distintas especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2009; Rozwandowicz et al., 2018).

-MOB_{P3}, MOB_{P51}, MOB_{F12}, MOB_{Q12}, MOB_{H11} y MOB_{P13}, pertenecientes a diferentes familias y subfamilias MOB al codificar para determinados tipos de relaxasas (Alvarado et al., 2012).

Las condiciones óptimas de trabajo con los diferentes *primers* seleccionados para estos genes aparecen en la **Tabla S4** de **Anexos**.

3.5.5. Detección de genes de resistencia a antibióticos

Se hicieron PCRs con el ADN de las cepas donadora, receptoras y las transconjugantes obtenidas en los dos procesos de conjugación, seleccionando 3 genes de resistencia, *blaCTX*, *blaTEM* y *blaSHV*, que codifican para enzimas pertenecientes a las 3 familias principales de BLEEs (CTX-M, TEM y SHV). Los *primers* empleados y sus condiciones óptimas de trabajo están recogidos en la **Tabla S3** de **Anexos**.

Además, también se hizo una PCR para amplificar el gen de resistencia al cloranfenicol *cat*, con el que se provocó el truncamiento de *fliC* en la cepa receptora AAG1. En este caso, los *primers* elaborados para este trabajo y los resultados de su puesta a punto se encuentran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones óptimas de los primers para el cassette de resistencia al cloranfenicol *cat* tras la puesta a punto.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL) para [10μM]	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Cita
cat	catA1-F1	TTCTTGCCCCGCTGATGAAT	1	200	60	Este trabajo
	catA1-R1	ACCGTAACACGCCACATCTT				

3.5.6. Detección de genes de virulencia

Como se comentó en la introducción las cepas *E. coli* patógenas poseen genes que codifican para una serie de FV implicados en diversos procesos y, a su vez, estos pueden ser vehiculados por plásmidos.

-Genes implicados en la captación de hierro: *chuA*, que da lugar a la formación de un receptor de hemoglobina en la membrana externa; *iucD* e *iutA*, que codifican para receptores férricos de aerobactina; *iroN*, que codifica para un receptor sideróforo; *fyuA*, que codifica para el receptor de yersiniabactina (Spurbeck et al., 2012; Wang et al., 2022).

-Genes que dan lugar a toxinas: *hlyF*; *hlyA*, implicado en la síntesis de la α-hemolisina, *vat*, que codifica para la toxina autotransportadora vacuolizante; y *tsh*, que codifica para la hemaglutinina sensible a la temperatura (Dozois et al., 2000; Wiles et al., 2008).

-El gen *yfcV*, que codifica para una adhesina (Spurbeck et al., 2012).

Los *primers* elegidos para cada uno de estos genes y sus condiciones óptimas aparecen recogidos en la **Tabla S1** y **Tabla S2** de **Anexos**.

3.6. Estudios fenotípicos

Estos estudios se realizaron para las cepas receptoras, la donante y las transconjugantes obtenidas durante los dos procesos de conjugación.

3.6.1. Expresión de la α -hemolisina

Para este ensayo con ayuda de un asa de siembra estéril se realizan estrías de las cepas a estudiar sobre el medio de cultivo agar sangre y se deja incubar a 37°C O/N. Al día siguiente se observa si se formaron halos indicadores de hemólisis alrededor de las colonias bacterianas.

3.6.2. Ensayo de movilidad

Para este ensayo se necesitan tubos en forma de U y que contengan el medio de cultivo MIL.

Primero, se siembra por picadura la cepa de interés y se deja incubar a 37°C O/N. Pasado el tiempo de incubación, se mira la turbidez del medio, si está turbio es indicativo de que la bacteria se ha movido y si no lo está, quiere decir que la bacteria no es móvil (crecimiento localizado únicamente en el punto de inoculación). Esto mismo se repite dos veces más, es decir, se hacen dos pases más, teniendo en cuenta que las bacterias que no se han movido hay que picarlas del lado del tubo donde se sembró el día anterior y las que son móviles del otro lado para favorecer la expresión de flagelos. Se hacen varios pases porque hay bacterias a las que les cuesta expresar su fenotipo de movilidad y en el primero no lo hacen.

3.6.3. Antibiogramas

Además, también se les hicieron los antibiogramas a los transconjugantes obtenidos en las dos conjugaciones con los mismos antibióticos representados en la **Tabla 1** y mediante la técnica de difusión en agar explicada en el punto 3.3.2.

4. Resultados y Discusión

4.1. Caracterización de las cepas

4.1.1. Caracterización fenotípica

El agar MacConkey lactosa es un medio selectivo en el que solo crecen las bacterias que son Gram negativas, y además es un medio diferencial ya que permite distinguir si son lactosa positivas o lactosa negativas (fenotipo *lac*). Esto es posible porque contiene un indicador de pH que hará que las colonias adquieran o no un color rojizo/rosa dependiendo de si las bacterias consumen la lactosa: Las bacterias lactosa positivas son las que consumen la lactosa del medio, la fermentan y producen ácidos que hacen que el pH se acidifique y las colonias adquieran un color rojo/rosa; mientras que las bacterias lactosa negativas no consumen lactosa, consumen peptonas, liberando amoníaco que elevará el pH del medio y las colonias serán incoloras.

El aislamiento de las cepas en agar MacConkey lactosa ha permitido observar su fenotipo *lac* y, además, la morfología de las colonias crecidas, pudiendo ser lisas (más circulares, con un borde suave y sin irregularidades) o rugosas (morfología más estrellada con un borde más irregular).

Todas las cepas crecieron por lo que se confirma, como era de esperar al tratarse de cepas *E. coli*, que son bacterias Gram negativas. En la **Tabla 3** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3. Resultados del fenotipo *lac* y la morfología de las distintas cepas clínicas.

Cepa	Fenotipo <i>lac</i>	Morfología
LREC_264	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_274	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_275	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_278	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_287	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_288	Lactosa positivo	Rugosa
LREC_289	Lactosa negativo	Rugosa
LREC_292	Lactosa negativo	Rugosa

4.1.2. Antibiogramas y fenotipos BLEE y AmpC

-Resistencia y sensibilidad a diferentes antibióticos

El perfil de resistencia de las 8 cepas se llevó a cabo empleando antibióticos de distintas familias y bajo los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) y del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST). Los resultados aparecen representados en la **Tabla 4**.

Los perfiles de resistencia a antibióticos confirman que todas las cepas son multirresistentes al mostrar resistencia frente a un mínimo de 3 antibióticos de distintas familias (Magiorakos et al., 2012):

- LREC_264 presenta resistencia frente a 8 de los antibióticos empleados: 1 penicilina (ampicilina), 3 cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 2 fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol) y 1 tetraciclina (tetraciclina).

- LREC_274 presenta resistencia frente a 10 de los antibióticos empleados: 2 penicilinas (amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina), 4 cefalosporinas (ceftazidima, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 monobactámico (aztreonam), 2 fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina) y 1 tetraciclina (tetraciclina).
- LREC_275 presenta resistencia frente a 11 de los antibióticos empleados: 2 penicilinas (amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina), 4 cefalosporinas (ceftazidima, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 monobactámico (aztreonam), 2 fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol) y 1 tetraciclina (doxiciclina, tetraciclina).
- LREC_278 presenta resistencia frente a 11 de los antibióticos empleados: 2 penicilinas (amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina), 4 cefalosporinas (ceftazidima, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 monobactámico (aztreonam), 1 fluoroquinolona (ácido nalidíxico), 1 aminoglucósido (gentamicina), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol) y 1 tetraciclina (tetraciclina).
- LREC_287 presenta resistencia frente a 7 de los antibióticos empleados: 1 penicilina (ampicilina), 3 cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 2 fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina) y 1 agente misceláneo (cotrimoxazol).
- LREC_288 presenta resistencia frente a 8 de los antibióticos empleados: 1 penicilina (ampicilina), 3 de la familia de las cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 monobactámico (aztreonam), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol), 1 tetraciclina (tetraciclina) y 1 fenicol (cloranfenicol).
- LREC_289 presenta resistencia frente a 5 de los antibióticos empleados: 1 penicilina (ampicilina), 3 cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona) y 1 fluoroquinolona (ácido nalidíxico).
- LREC_292 presenta resistencia frente a 8 de los antibióticos empleados: 2 penicilinas (amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina), 3 cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 fluoroquinolona (ácido nalidíxico), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol) y 1 tetraciclina (tetraciclina).

Tabla 4. Resultados de los antibiogramas de las 8 cepas clínicas.

	AMC30	AM10	CZ30	CXM30	FOX30	CAZ30	CRO30	IMP10	ATM30	NAL30	CIP5	AN30	GM10	SXT25	D30	TE30	C30
LREC_264	S	R	R	R	S	S	R	S	S*	R	R	S	S	R	S	R	S
LREC_274	R	R	R	R	S	R	R	S	I*	R	R	S	S	S	S	R	S
LREC_275	I*	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S
LREC_278	I*	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	R	I	R	S
LREC_287	S	R	R	R	S	S	R	S	I	R	R	S	S	R	S	S	S
LREC_288	S*	R	R	R	S	I*	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R
LREC_289	S*	R	R	R	S	S	R	S	S	R	I*	S	S	S	S	S	S
LREC_292	I*	R	R	R	S	S	R	S	S*	R	I*	S	S	R	S	R	S

Se presentan en esta tabla los resultados analizados según el criterio de CLSI (del inglés, Clinical & Laboratory Standards Institute), en caso de discordancia con el criterio de EUCAST (del inglés, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se marcarán con un asterisco (*) y se especificará. R y el color verde indican resistencia; I y el color amarillo, intermedio; y S y el color rojo, sensibilidad. En las filas están las 8 cepas y en las columnas los antibióticos, AMC30: Amoxicilina-clavulánico, AM10: Ampicilina, CZ30: Cefazolina, CXM30: Cefuroxima, FOX30: Cefoxitina, CAZ30: Ceftazidima, CRO30: Ceftriaxona, IMP10: Imipenem, ATM30: Aztreonam, NAL30: Ácido nalidíxico, CIP5: Ciprofloxacina, AN30: Amikacina, GM10: Gentamicina, SXT25: Cotrimoxazol, D30: Doxiciclina, TE30: Tetraciclina, y C30: Cloranfenicol.

*LREC_264: ATM 30 S (CLSI) e I (EUCAST).

*LREC_274: ATM30 I (CLSI) y R (EUCAST).

*LREC_275: AMC30 I (CLSI) y R (EUCAST).

*LREC_278: AMC30 I (CLSI) y R (EUCAST).

*LREC_288: AMC30 S (CLSI) y R (EUCAST); y CAZ30 I (CLSI) y S (EUCAST).

*LREC_289: AMC30 S (CLSI) y I (EUCAST); y CIP5 I (CLSI) y S (EUCAST).

*LREC_292: AMC30 I (CLSI) y R (EUCAST); ATM30 S (CLSI) y I (EUCAST); y CIP5 I (CLSI) y S (EUCAST).

-Fenotipos BLEE y AmpC

Tanto la prueba de sinergia de doble disco como la prueba de discos combinados con inhibidor confirmaron que todas las cepas clínicas ensayadas eran productoras de BLEEs (Figura 3 y Tabla 5).



Figura 3. Sinergia en la cepa LREC_292.

En el caso de la prueba de sinergia de doble disco todas las cepas mostraron sinergia entre el disco central de ácido clavulánico y varios de los discos de alrededor, esta se reconoce porque tiene forma de “cerradura” o “corcho de champagne”, dando así como resultado que las 8 son productoras de BLEEs.

Tabla 5. Resultados de la prueba de discos combinados para 8 cepas de *E. coli* ST131 procedentes de infecciones extraintestinales humanas.

Antibiótico	Diámetro halo (mm)							
	LREC_264	LREC_274	LREC_275	LREC_278	LREC_287	LREC_288	LREC_289	LREC_292
CTX	8	0	0	0	0	0	11	10
CTX-CLA	31	38	29	32	34	32	30	29
CAZ	22	21	16	12	20	19	25	22
CAZ-CLA	32	44	30	35	37	33	28	27

Diámetros de los halos que se formaban alrededor del disco de antibiótico con y sin ácido clavulánico. CLA (ácido clavulánico), CTX (cefotaxima), CTX-CLA (cefotaxima con ácido clavulánico), CAZ (ceftazidima) y CAZ-CLA (ceftazidima con ácido clavulánico).

Además, ambas pruebas permitían determinar si eran cepas productoras de β -lactamasas AmpC, si se observaba algún indicio de resistencia en torno al inhibidor (el ácido clavulánico) y/o de sensibilidad frente a la cefepima (cefalosporina de 4ª generación) en la prueba de sinergia de doble disco, o si había resistencia frente al disco de cefoxitina (antibiótico que pueden hidrolizar las AmpC pero no las BLEEs), en la prueba de discos combinados con inhibidor. No obstante, no se ha dado ninguno de estos casos en ninguna de las cepas. Por consiguiente, todas las cepas producen BLEEs pero no β -lactamasas AmpC.

4.1.3. Caracterización genotípica del perfil BLEE y ExPEC

Con el fin de completar la caracterización molecular de las 8 cepas clínicas se realizó la detección de genes asociados a los perfiles de resistencia y de genes de virulencia que sirven como marcadores para la determinación presuntiva de los distintos patotipos en *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.

Buscamos por PCR los genes relacionados con la producción de β -lactamasas asociadas al fenotipo BLEE (TEM, SHV y CTX-M). En todos los casos pudieron ser detectados al menos uno de estos genes, a excepción de la cepa LREC_275, que no presentaba ninguno de los tres genes

seleccionados. Es probable que, esta cepa posea algún otro gen implicado en el fenotipo BLEE, o bien que presente una variante genética que no sea detectada por los *primers* empleados en este trabajo.

En cuanto al patotipo ExPEC, una cepa se considera perteneciente a este grupo si presenta al menos dos de los seis genes de virulencia seleccionados como marcadores (J. R. Johnson et al., 2015). Esta condición se cumple en todas las cepas clínicas analizadas, excepto en LREC_274 y LREC_278. Sin embargo, los resultados previos obtenidos mediante secuenciación del genoma completo (WGS) permitieron la clasificación de estas cepas como ExPEC y UPEC. Cabe destacar que los genes marcadores utilizados en dichas designaciones suelen estar vehiculizados por plásmidos u otros elementos móviles (Sarowska et al., 2019). Por tanto, es posible que, al no haberse utilizado en este análisis la misma colonia enviada para secuenciación, sino descendientes cultivados sin presión selectiva por antibióticos, se haya producido la pérdida de uno o varios de estos plásmidos. En un futuro, convendría confirmar estos resultados partiendo de la copia realizada de la colonia secuenciada, que está conservada a -80°C en el LREC.

4.2. Estudios de conjugación

4.2.1. Conjugación

De entre las 8 cepas de trabajo iniciales se seleccionaron las 7 que eran resistentes a la ampicilina y sensibles al cloranfenicol (LREC_264, LREC_274, LREC_275, LREC_278, LREC_287, LREC_289 y LREC_292). La cepa LREC_288 aunque sí era resistente a la ampicilina también lo era al cloranfenicol por lo que se descartó por ser incompatible con los marcadores de selección de la receptora AAG1.

Con esas 7 cepas se hizo la primera conjugación con la cepa AAG1 como receptora y solo con una de ellas se obtuvieron transconjugantes, la LREC_292. En estas condiciones, la frecuencia de conjugación fue muy baja ya que solo crecieron 6 colonias de transconjugantes en la siembra directa y observamos ausencia de crecimiento en las siembras realizadas a partir de las diluciones. Para confirmar que se había producido la conjugación se repitió el proceso pero aumentando de 4 a 24 las horas de incubación del microtubo de conjugación a 37°C. Con este cambio crecieron más de 300 colonias en los tres cultivos (siembra directa, dilución 1 y dilución 2). Estos resultados se confirmaron realizando 3 resiembras de estas colonias transconjugantes y ver que crecían en LB agar AMP100 + CM20 y mostraban un fenotipo lactosa negativo en el medio agar MacConkey lactosa. Estos resultados se presentan en la **Figura 4**.

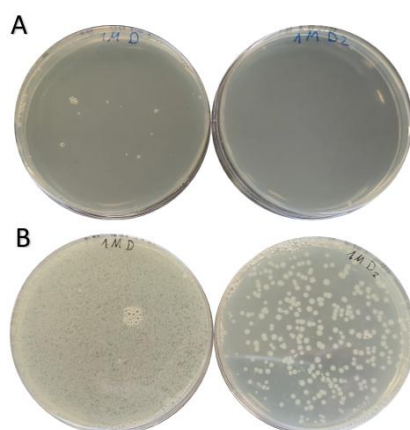


Figura 4. Resultados de la primera conjugación.

Se puede ver como con 4 horas de incubación (A) se obtienen muy pocos transconjugantes y solo en la siembra directa ("1M D", la primera placa de las dos de arriba), y con 25 horas (B) ya hay mucho crecimiento incluso en el cultivo que se hizo a partir de la dilución 2 ("1M D2", la segunda placa de las dos de abajo).

Con los transconjugantes obtenidos se hizo la segunda conjugación con la cepa comensal MG1655 como receptora y también se obtuvieron transconjugantes con el fenotipo adecuado, lactosa positivos y que crecían en presencia de ampicilina como se ve en la **Figura 5**.

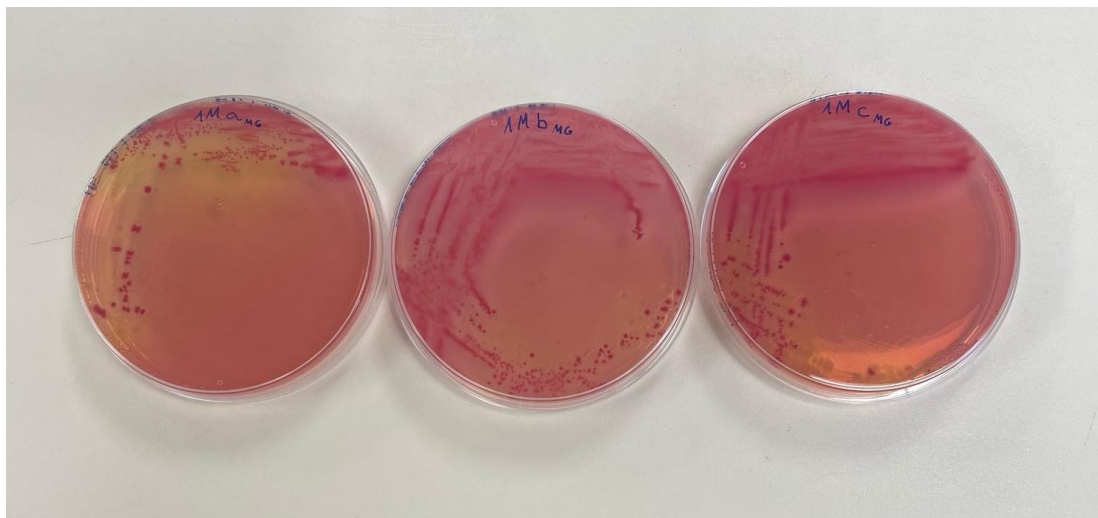


Figura 5. Fenotipo de los transconjugantes tras la segunda conjugación en agar MacConkey lactosa.

Siembra en agar MacConkey lactosa AMP100 a partir de tres colonias (a, b y c) de la cepa transconjugante obtenida tras la segunda conjugación. En los tres casos se ve como la cepa transconjugante tiene el fenotipo adecuado: Es lactosa positiva y crece en presencia de ampicilina.

Algunas investigaciones han reportado bajas frecuencias de conjugación *in vitro* en cepas de origen clínico, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio (Mahérault et al., 2019). No obstante, estudios previos de secuenciación del genoma completo (WGS) han demostrado la presencia de al menos un plásmido del tipo IncF en el plasmidoma de todas las cepas donadoras utilizadas en este trabajo (Flament Simon, 2021). A pesar de ello, la frecuencia de conjugación observada *in vitro* ha sido muy baja, lo que podría atribuirse a la pérdida o inactivación de los genes del operón *tra*, responsables de la formación del pilus conjugativo en los plásmidos. Además, es posible que las condiciones experimentales empleadas no sean óptimas para la expresión de los genes relacionados con la conjugación en estas cepas. En futuras investigaciones, sería recomendable evaluar la conjugación en medio sólido e incluso durante la formación de biopelículas, donde podrían reproducirse mejor las condiciones naturales que favorecen este proceso.

4.2.2. Curva de multiplicación y conjugación en diferentes condiciones

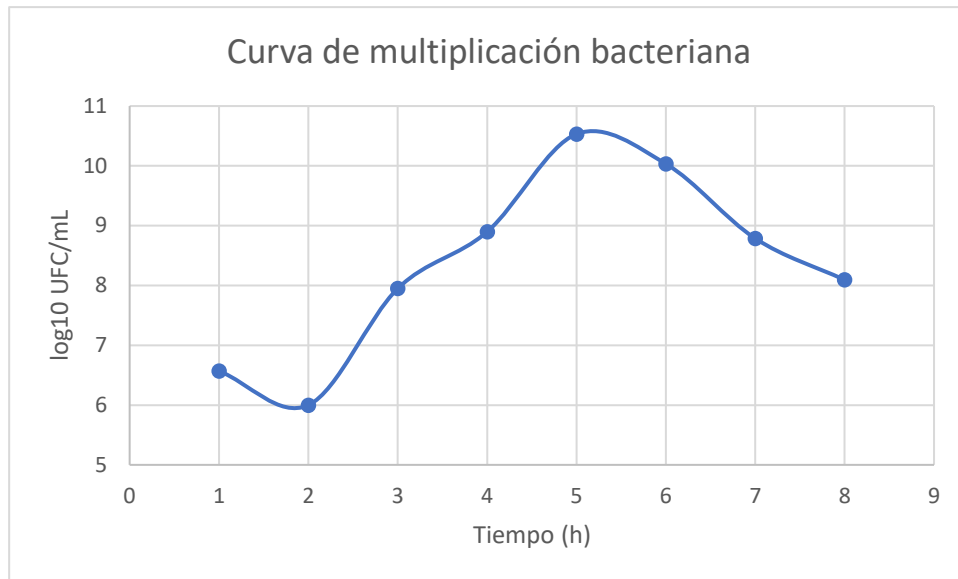


Figura 6. Curva de multiplicación bacteriana resultante de la cepa LREC_292.

Se representan las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), frente al tiempo en horas.

Como se puede ver en la gráfica de la **Figura 6**, la fase exponencial tiene lugar aproximadamente entre las 2 y las 5 horas, por lo que se escogió como punto representativo de esta fase el de las 4 horas de incubación, que es uno de los que muestra mayor pendiente en la curva y por lo tanto, mayor tasa de crecimiento. La fase de estacionaria es aquella en la que el número de bacterias nuevas que se producen es igual al número de bacterias que mueren, por lo que no hay crecimiento neto. Esta etapa se alcanza entre las 5 y las 6 horas, luego la curva aumenta su descenso lo que es indicativo de muerte bacteriana.

Al comparar la curva de crecimiento bacteriano de la cepa donadora LREC_292, una *E. coli* patógena, con la de la cepa comensal K-12 MG1655, se observa que esta última presenta una mayor velocidad de multiplicación, tal como se muestra en la **Figura 7**. La presencia de uno o varios plásmidos en la cepa LREC_292 puede ser una posible explicación de esta ralentización de la multiplicación bacteriana por parte de la cepa patógena, ya que las bacterias comensales tienden a tener genomas más pequeños con el fin de alcanzar una replicación más rápida (mayor *fitness*) y los plásmidos suponen una mayor cantidad de ADN a replicar, que conlleva una mayor carga energética (tiene un coste sobre el *fitness*).

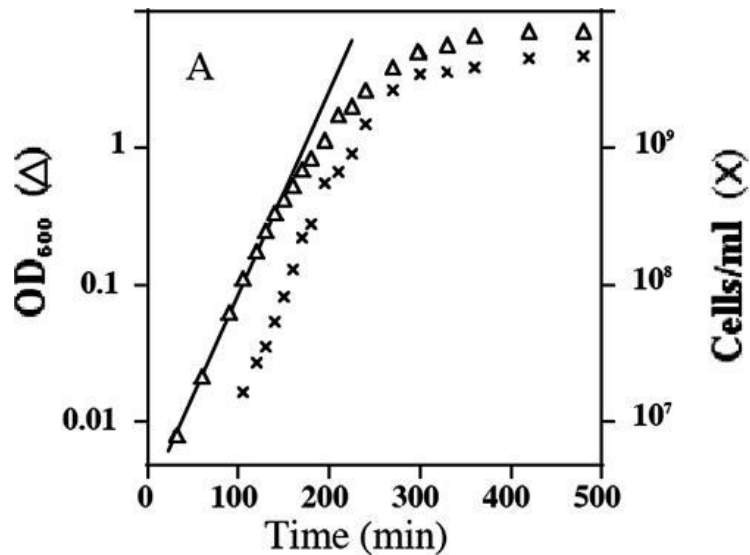


Figura 7. Curva de multiplicación bacteriana cepa K-12 MG1655.

Curva de multiplicación de un cultivo overnight de la cepa K-12 MG1655 sembrado en LB caldo (diluyéndolo 5000 veces), a 37°C y con aireación vigorosa. Se representa el tiempo en minutos en el eje de abscisas frente a la densidad óptica a 600 nm (triángulos) y la densidad celular en células por mL (cruces). Como se puede observar, aproximadamente a las 2 horas y media (150 minutos) es cuando se alcanza mayor pendiente en la curva y por lo tanto mayor tasa de crecimiento, en la fase exponencial, y a la fase estacionaria se llega un poco antes de las 5 horas (300 minutos). Adaptado de "Growth of *E. coli* MG1655 in Luria-Bertani broth" (Guennadi et al., 2007).

Teniendo en cuenta la curva de multiplicación obtenida y representada en la **Figura 6**, se realizó el protocolo de conjugación a las 4 (fase exponencial) y a las 6 horas (fase estacionaria) de iniciar el crecimiento de la bacteria donadora LREC_292 y en los dos medios de cultivo descritos previamente en el apartado de materiales y métodos (LB y medio mínimo).

Como resultado de esta conjugación en diferentes situaciones, se observó que había un mayor número de colonias transconjugantes en el medio LB agar AMP100+CM20, un medio con mayor cantidad de nutrientes que en el medio mínimo agar AMP100+CM20, el cual contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento bacteriano y donde no fue capaz de crecer ninguna colonia en ninguna de las dos fases de multiplicación bacteriana. En lo referente a las fases de crecimiento, se vio un mayor número de colonias de transconjugantes en la fase estacionaria. Con todo esto se deduce que las mejores condiciones de conjugación de la cepa LREC_292 con la AAG1 es en presencia de una mayor cantidad de nutrientes, es decir en el medio LB agar AMP100+CM20, y cuando alcanza la fase estacionaria de crecimiento (**Figura 8**).

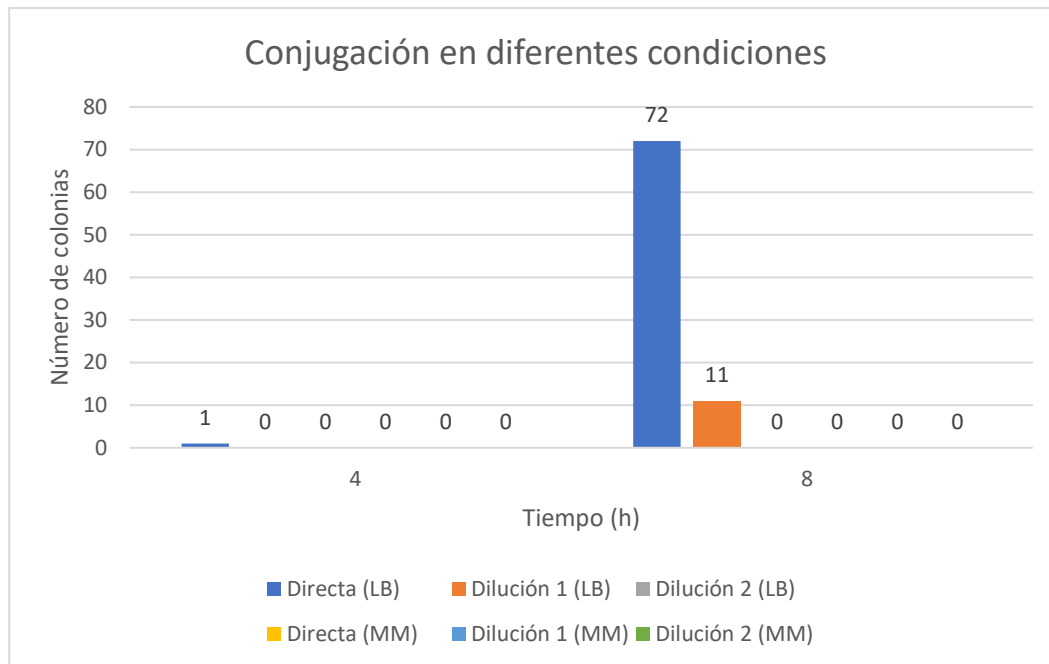


Figura 8. Resultados de la conjugación en diferentes condiciones.

En este gráfico de barras se representa el número de colonias de transconjugantes obtenidas en distintas fases de la curva de multiplicación bacteriana (fase exponencial, que se corresponde con las 4 horas, y fase estacionaria, que corresponde con las 8 horas, diluidas hasta 2 veces (dilución 1 y 2) a partir de la solución madre (directa) y en presencia de una mayor (medio Luria-Bertani, LB) o menor (medio mínimo, MM) cantidad de nutrientes.

Al realizar el estudio de las características de la conjugación, se pudo comparar cómo se da esta en diferentes fases de la curva de multiplicación bacteriana (exponencial y estacionaria) y con distinta disponibilidad de nutrientes, y se observó que este proceso se ve incrementado en condiciones favorables, definidas por una mayor carga bacteriana y una cantidad superior de nutrientes proporcionados. Esto puede justificarse por el mayor número de bacterias que hay en la fase estacionaria y que hace que aumente con ello la cantidad de donadoras que conjugan con las receptoras, pero también puede estar relacionado con la carga energética que conlleva la adquisición de plásmidos a través de la conjugación (San Millan & MacLean, 2017).

A mayor concentración de nutrientes mayor aporte de energía, favoreciendo que se pueda dar este proceso. Además, el coste energético que implica la conjugación conlleva una disminución del crecimiento bacteriano. Muchas veces para hacer frente a esta limitación, los genes del plásmido involucrados en dicho proceso se autorregulan (San Millan & MacLean, 2017). Esto también podría justificarse por qué en la fase exponencial, que se caracteriza por ser la etapa donde hay una mayor proliferación bacteriana, la conjugación es menor que en la fase estacionaria, donde la multiplicación disminuye al equilibrarse con la muerte de las bacterias.

4.3. Estudios genotípicos

Mediante los ensayos de PCR se vio que la cepa donadora LREC_292, poseía los genes de los replicones IncFII e IncFIB y de la relaxasa MOBF12, el gen de resistencia *blaTEM* y los genes de virulencia *chuA*, *fyuA* y *yfcV*. En la **Tabla 6** se muestra cuáles de estos se pudieron transferir por conjugación.

Tabla 6. Resultados de las PCRs de las cepas donadora, receptoras y sus transconjugantes.

Genes	LREC_292	AAG1	AAG1-TC	MG1655	MG1655-TC
IncFII	+	-	+	-	-
IncFIB	+	-	+	-	-
MOBF12	+	-	+	-	-
blaTEM	+	-	+	-	+
chuA	+	-	+	-	-
fyuA	+	-	+	-	-
yfcV	+	-	+	-	-
cat	-	+	+	-	-

La tabla recoge en las columnas la cepa donadora (LREC_292), las cepas receptoras (AAG1 y MG1655) y sus transconjugantes (AAG1-TC y MG1655-TC), y en las filas los genes que por PCR se detectaron en algunas de ellas. Se usa un código de signos y colores para indicar la presencia (signo +, color verde) o ausencia (signo -, color rojo), del gen en cuestión. (Solo se presentan los genes que se detectaron en alguna de las cepas).

El tipado de los plásmidos se realizó mediante la detección por PCR de los replicones (Inc) y la relaxasa (MOB). Además, realizamos la detección de los genes de resistencia y virulencia que se transmitieron.

La **Tabla 6** resume los resultados obtenidos mediante PCR. El análisis comparativo de los perfiles genéticos revela que los genes IncFII, IncFIB, MOBF12, *chuA*, *fyuA* y *yfcV* estaban presentes tanto en la cepa donadora LREC_292 como en la transconjugante de AAG1 (AAG1-TC). En cambio, en la cepa receptora de la segunda conjugación (MG1655), estos genes no se detectaron, observándose únicamente la transferencia del gen *blaTEM*. Estos resultados sugieren que los genes mencionados fueron transferidos durante la primera conjugación, pero no en la segunda, lo que indica que podrían estar asociados a distintos elementos genéticos móviles con capacidades de transferencia distintas.

Como se comentó en la introducción, las clasificaciones plasmídicas basadas en los grupos de incompatibilidad (Inc) y el tipo de relaxasa (MOB) suelen ser complementarias y, en muchos casos, están interrelacionadas. En general, los plásmidos de la familia IncF codifican una relaxasa perteneciente a la subfamilia MOB_{F12} (Alvarado et al., 2012; Rozwandowicz et al., 2018). Asimismo, el IncF es el plásmido multirreplicón más ampliamente caracterizado, habitualmente asociado a los replicones FII, FIA y/o FIB (Rozwandowicz et al., 2018). Estos plásmidos son característicos de diversas especies de *Enterobacteriaceae*, incluida *E. coli*, y están frecuentemente implicados en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y virulencia (Alvarado et al., 2012; Mathers et al., 2015; Rozwandowicz et al., 2018; Villa et al., 2010).

A partir de estas observaciones, puede deducirse que los genes detectados en el análisis anterior (IncFII, IncFIB, MOBF12, *chuA*, *fyuA* y *yfcV*) están asociados a un mismo plásmido IncF.

En este caso particular, el plásmido IncF identificado en la cepa donadora LREC_292 porta tres genes de virulencia relacionados con la captación del hierro y adhesión: *chuA*, *fyuA* y *yfcV*. La presencia simultánea de estos tres genes permite clasificar a esta cepa como perteneciente al patotipo uropatógeno (UPEC) (Spurbeck et al., 2012).

Por otro lado, el gen de resistencia a betalactámicos *blaTEM*, responsable de la producción de BLEE, fue detectado tanto en la cepa donadora LREC_292 como en las transconjugantes AAG1-TC y MG1655-TC. Esto indica que este gen se transfirió en ambas conjugaciones, lo que sugiere que forma parte de un plásmido distinto al previamente descrito. Este segundo plásmido no ha podido ser clasificado con los *primers* utilizados para los grupos Inc y MOB en este estudio, por lo que sería recomendable ampliar el análisis. Por ejemplo, podría optarse por la extracción y secuenciación del plásmido para su caracterización completa.

El gen de BLEE *blaTEM* confiere una fuerte resistencia frente a las penicilinas, entre las que se encuentra la ampicilina (Rodríguez-Beltrán et al., 2021), un antibiótico cuyo uso está ampliamente extendido y que lleva ya mucho tiempo aplicándose para tratar infecciones bacterianas. Por ello, la transmisión de su resistencia puede ser más común y sencilla, como observamos en los resultados de este trabajo, ya que la presión selectiva del uso de dicho antibiótico lleva actuando más tiempo que en el caso de otros.

Los resultados previos obtenidos mediante el análisis del genoma completo y la reconstrucción del plásmido de la cepa LREC_292 indican que esta cepa porta un único plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncF, el cual sería responsable de la transferencia del gen *blaTEM*, lo que concuerda parcialmente con los resultados observados en este estudio. Además, dicho análisis reveló la presencia de un elemento genético integrativo y conjugativo (ICE) en el cromosoma de la cepa, asociado a una relaxasa de tipo MOB_H (Flament Simon, 2021).

4.4. Estudios fenotípicos

Finalmente, se realizaron estudios fenotípicos para ver cómo influía la adquisición de plásmidos por conjugación en la fisiología de las bacterias receptoras. Se hicieron con las cepas receptoras, la donante y las transconjugantes obtenidas durante los dos procesos de conjugación. Pero los resultados que realmente interesan son los de cómo varía la fisiología de la receptora MG1655 al adquirir el plásmido, ya que esta es una *E. coli* comensal modelo que representa lo que le ocurriría a una *E. coli* comensal del intestino, a diferencia de la AAG1 que es un mutante y se aleja más de la realidad.

4.4.1. Ensayos de expresión de la α -hemolisina y de movilidad

En el ensayo de la expresión de la α -hemolisina, ninguna de las cepas implicadas mostró hemólisis al no observarse ningún tipo de halo alrededor de las colonias crecidas en agar sangre. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en las PCRs ya que muestran que ninguna de las cepas poseía el gen *hlyA*, el cual codifica para la síntesis de esta toxina implicada en la hemólisis, la α -hemolisina (Wiles et al., 2008).

En cuanto a la prueba de movilidad, solo se observó movilidad en la cepa MG1655 y su transconjugante, lo que indica que la cepa donadora LREC_292 no es móvil. Por lo tanto, esta característica no se transfiere a la cepa receptora tras la conjugación. Asimismo, en el caso de AAG1 y su transconjugante, los resultados obtenidos fueron los esperados. Tal como se confirma mediante PCR, únicamente estas dos cepas poseen el *cassette* de resistencia al cloranfenicol *cat*, el cual se empleó para interrumpir al gen *fliC* de la MG1655, implicado en la movilidad, generando así la cepa mutante AAG1, no móvil pero resistente al cloranfenicol.

4.4.2. Antibiogramas

Tras hacer los antibiogramas, siguiendo la técnica de difusión en agar y empleando los discos de los antibióticos que aparecen en la **Tabla 1**, se obtuvieron los siguientes resultados:

- La cepa AAG1 solamente presentó resistencia frente al cloranfenicol.
- La cepa transconjugante de AAG1 presentó resistencia frente a 9 antibióticos: 2 penicilinas (amoxicilina con ácido clavulánico, ampicilina), 3 cefalosporinas (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona), 1 fluoroquinolona (ácido nalidíxico), 1 agente misceláneo (cotrimoxazol), 1 tetraciclina (tetraciclina) y 1 fenicol (cloranfenicol).
- La cepa MG1655 fue sensible a todos los antibióticos.
- La cepa transconjugante de MG1655 solamente presentó resistencia frente a 2 penicilinas la amoxicilina-clavulánico y la ampicilina.

Tabla 7. Resultados de los antibiogramas de las cepas A82, AAG1, MG1655 y sus transconjugantes.

	AMC30	AM10	CZ30	CXM30	FOX30	CAZ30	CRO30	IMP10	ATM30	NAL30	CIP5	AN30	GM10	SXT25	D30	TE30	C30
LREC_292	I*	R	R	R	S	S	R	S	S*	R	I*	S	S	R	S	R	S
AAG1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I*	S	S	S	S	R
AAG1-TC	R	R	R	R	S	S	R	S	S*	R	S	S	S	R	I	R	R
MG1655	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MG1655-TC	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Se presentan en esta tabla los resultados analizados según el criterio de CLSI (del inglés, Clinical & Laboratory Standards Institute), en caso de discordancia con el criterio de EUCAST (del inglés, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se marcarán con un asterisco (*) y se especificará. R y el color verde indican resistencia; I y el color amarillo, intermedio; y S y el color rojo, sensibilidad. En las filas están las cepas y en las columnas los antibióticos, AMC30: Amoxicilina-clavulánico, AM10: Ampicilina, CZ30: Cefazolina, CXM30: Cefuroxima, FOX30: Cefoxitina, CAZ30: Ceftazidima, CRO30: Ceftriaxona, IMP10: Imipenem, ATM30: Aztreonam, NAL30: Ácido nalidíxico, CIP5: Ciprofloxacina, AN30: Amikacina, GM10: Gentamicina, STX25: Cotrimoxazol, D30: Doxiciclina, TE30: Tetraciclina, y C30: Cloranfenicol.

*LREC_292: ATM 30 S (CLSI) e I (EUCAST); AMC30 I (CLSI) y R (EUCAST); y CIP5 I (CLSI) y S (EUCAST).

*AAG1: AN30 I (CLSI) y S (EUCAST).

*AAG1-TC: ATM 30 S (CLSI) e I (EUCAST).

Haciendo una comparación entre los antibiogramas de la cepa donadora, las receptoras y sus transconjugantes, como se muestra en la **Tabla 7**, se observa que se transmiten muchas más resistencias a antibióticos en el caso de AAG1 que en el caso de la MG1655, a la cual solo se transmite resistencia frente a dos de los antibióticos empleados. Estos resultados se exponen a continuación:

- La AAG1 adquiere mediante la conjugación resistencia a la amoxicilina combinada con el ácido clavulánico, ampicilina, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, ácido nalidíxico, cotrimoxazol y tetraciclina.
- La MG1655 adquiere mediante la conjugación resistencia a la amoxicilina combinada con el ácido clavulánico y a la ampicilina.

Relacionando esto con el análisis de las PCRs, es probable que la mayoría de los genes de resistencia que la cepa transconjugante de AAG1 expresa nuevos, estén codificados también por el plásmido IncF MOB_{F12} encargado de transmitir los tres genes de virulencia *chuA*, *fyuA* y *yfcV*, ya que solo se transfirieron a la receptora en la primera conjugación, como ocurre con algunos de estos genes de resistencia. Además, se realizó un análisis *in silico* del plásmido pLREC292_1 obtenido de la reconstrucción del plasmidoma de LREC_292 y se detectaron los siguientes genes de resistencia: *aadA5*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *blaTEM-1B*, *mph(A)*, *sul1*, *tet(A)*, *dfrA17* (Flament Simon, 2021), lo cual corrobora esta hipótesis. La resistencia al cloranfenicol está codificada por el cromosoma de la AAG1, y la resistencia a ampicilina y amoxicilina combinada con ácido clavulánico, al tratarse de penicilinas, se transmite por el elemento genético móvil que posee el gen *blaTEM*. En el caso de la amoxicilina combinada con el ácido clavulánico, la resistencia al inhibidor de β -lactamasas debe estar asociado a otro mecanismo complementario, algunas investigaciones lo asocian a una sobre expresión de *blaTEM* (Stapleton et al., 1995).

Este trabajo estudia el impacto de la adquisición de plásmidos mediante conjugación en bacterias, analizando sus características genéticas (genes codificados y clasificación Inc/MOB). Como receptoras, se emplearon cepas modelo de genoma conocido, y como donantes, cepas *E. coli* ExPEC multirresistentes del clon ST131, de las cuales se había realizado la secuenciación de su genoma completo con técnicas de segunda generación, aisladas de infecciones humanas y asociadas a la diseminación global de resistencia antibiótica (Cave et al., 2023; Pitout et al., 2022).

La transferencia de plásmidos con genes de resistencia y virulencia es clave en la emergencia de patógenos multirresistentes, complicando el tratamiento de infecciones. Entender los mecanismos de conjugación podría revelar dianas para inhibir este proceso o mejorar técnicas de curado plasmídico (eliminación de plásmidos en poblaciones bacterianas), una estrategia prometedora pero poco explorada *in vivo* (Buckner et al., 2018).

Perspectivas futuras:

-Optimizar los ensayos de conjugación. Los resultados obtenidos de los estudios de conjugación muestran que las cepas ExPEC humanas conjugan en baja proporción, al observarse por ejemplo en el caso del primer ensayo que de las 7 cepas iniciales solo una de ellas conjugó con la receptora y además se obtuvo un número muy bajo de colonias transconjugantes. Esto no es concordante con el gran problema del aumento de la propagación de cepas multirresistentes que se describe en la introducción. Es por ello que probablemente las condiciones de trabajo empleadas durante los ensayos no sean las más adecuadas y ralenticen el proceso de conjugación, con lo cual sería necesario probar en otras condiciones que, aunque sean *in vitro* y no vayan a reproducir exactamente lo que se da en la naturaleza, se parezcan más a lo que pasa en el organismo. Por ejemplo, se podría emplear la orina como medio de cultivo, trabajar con biofilms o incluso intentar

simular las condiciones intestinales y extraintestinales con modelos celulares, como el que emplea una monocapa de células intestinales simulando la permeabilidad del epitelio intestinal (Cruz et al., 1994) o el *organ-on-a-chip*, dispositivo de microfluídica que simula las condiciones del órgano de interés. Además, es necesario repetir más veces estos ensayos para asegurar la reproducibilidad. También se propone ampliar el número de cepas de trabajo para así tener valores suficientes y poder hacer estadísticas.

-Caracterización funcional detallada de los plásmidos transferidos. Para ello se propone la extracción y secuenciación de los plásmidos transferidos en el proceso de conjugación. Para ello es de interés tratar de combinar las tecnologías de secuenciación de segunda generación (lecturas cortas con baja tasa de error) con las de tercera generación (lecturas largas con mayor tasa de error), que facilitarán el ensamblaje completo del plásmido.

Además, se plantea la implementación de estrategias de mutagénesis dirigida, para estudiar la función de genes específicos y su papel en la regulación de mecanismos funcionales y adaptativos que permiten a los plásmidos mantener su estabilidad, replicación, transferencia e interacción con el hospedador bacteriano.

5. Conclusiones

Este trabajo ha permitido estudiar la transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia mediante conjugación bacteriana, así como evaluar el impacto fisiológico de la adquisición de plásmidos en cepas receptoras. Los principales hallazgos son los siguientes:

1. De las ocho cepas clínicas de *E. coli* ST131 analizadas inicialmente, solo siete cumplieron los requisitos para actuar como donantes (sensibles a cloranfenicol y resistentes a ampicilina). En las condiciones experimentales empleadas, únicamente una de estas siete cepas fue capaz de transferir plásmidos a la bacteria receptora, lo que sugiere que o bien la eficiencia de conjugación es baja en estas cepas, o que las condiciones de ensayo no son las óptimas para este proceso.
2. Los resultados indican que la conjugación ocurre preferentemente en fases avanzadas del crecimiento bacteriano (fase estacionaria), cuando la densidad celular es mayor y los nutrientes más abundantes. Sin embargo, el hecho de que todas las cepas analizadas posean plásmidos conjugativos (confirmado por secuenciación) pero solo una haya transferido material genético, apunta a que los sistemas de conjugación podrían estar sometidos a una regulación compleja o que las condiciones *in vitro* no reproducen adecuadamente el entorno natural donde ocurre este proceso.
3. Se demostró la transferencia de tres genes de virulencia característicos del patotipo UPEC (*chuA*, *fyuA* y *yfcV*), así como de varios genes de resistencia, incluyendo *blaTEM* y presuntos determinantes de resistencia a ácido nalidíxico, cotrimoxazol y tetraciclina. Estos hallazgos confirman el papel crucial de los plásmidos IncF en la diseminación simultánea de factores de virulencia y resistencia, contribuyendo al éxito del clon ST131 y a la emergencia de cepas patógenas multirresistentes.
4. La transferencia de plásmidos IncF demuestra un impacto significativo en la fisiología de las cepas receptoras, particularmente en la adquisición de resistencia a antibióticos. Sin embargo, este proceso no afectó otras características analizadas, como la motilidad o la capacidad de producir hemolisina.

Los resultados de este trabajo subrayan la complejidad de los procesos de conjugación y la necesidad de optimizar los modelos experimentales para comprender mejor los mecanismos que gobiernan la transferencia horizontal de genes en condiciones naturales. Futuros estudios deberán explorar estrategias para bloquear esta vía de diseminación de resistencias, así como caracterizar los factores que limitan o favorecen la adquisición de plásmidos en diferentes contextos bacterianos.

6. Bibliografía

- Åberg, A., Shingler, V., & Balsalobre, C. (2008). Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1223–1241.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Barry, A. L., Thornsberry, C., Jones, R. N., & Gerlach, E. H. (1980). Interpretive standards for disk susceptibility tests with Sch 21420 and amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(4), 616–621. <https://doi.org/10.1128/aac.18.4.616>
- Buckner, M. M. C., Ciusa, M. L., & Piddock, L. J. V. (2018). Strategies to combat antimicrobial resistance: Anti-plasmid and plasmid curing. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 42, Issue 6, pp. 781–804). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy031>
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/aac.01707-08>
- Carmo, L. P., Schüpbach-Regula, G., Müntener, C., Chevance, A., Moulin, G., & Magouras, I. (2017). Approaches for quantifying antimicrobial consumption per animal species based on national sales data: A Swiss example, 2006 to 2013. *Eurosurveillance*, 22(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30458>
- Cave, R., Ter-Stepanyan, M. M., & Mkrtchyan, H. V. (2023). Short- and Long-Read Sequencing Reveals the Presence and Evolution of an IncF Plasmid Harboring bla CTX-M-15 and bla CTX-M-27 Genes in Escherichia coli ST131. *Microbiology Spectrum*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00356-23>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65.
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in Escherichia coli, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117.
- Costa, T. R. D., Ilangovan, A., Ukleja, M., Redzej, A., Santini, J. M., Smith, T. K., Egelman, E. H., & Waksman, G. (2016). Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell*, 166(6), 1436-1444.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.025>
- Cruz, N., Qi, L., Alvarez, X., Berg, R. D., & Deitch, E. A. (1994). The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 15(3), 207–212.
- Dahbi, G., Mora, A., Mamani, R., López, C., Alonso, M. P., Marzoa, J., Blanco, M., Herrera, A., Viso, S., García-Garrote, F., Tchesnokova, V., Billig, M., de la Cruz, F., de Toro, M., González-López, J. J., Prats, G., Chaves, F., Martínez-Martínez, L., López-Cerezo, L., ... Blanco, J. (2014). Molecular epidemiology and virulence of Escherichia coli O16:H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1247–1257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.10.002>
- Decano, A. G., Tran, N., Al-Foori, H., Al-Awadi, B., Campbell, L., Ellison, K., Mirabueno, L. P., Nelson, M., Power, S., Smith, G., Smyth, C., Vance, Z., Woods, C., Rahm, A., & Downing, T. (2021).

- Plasmids shape the diverse accessory resistomes of *Escherichia coli* ST131. *Access Microbiology*, 3(1). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000179>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 37–54). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., & Curtiss, R. (2000). Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the tsh Genetic Region. *Infection and Immunity*, 68(7), 4145–4154. <https://doi.org/10.1128/iai.68.7.4145-4154.2000>
- European Commission. (2017). *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) CONTENTS*. <http://www.who.int/entity/drugresistance/documents/surveillancereport/en/index.html>
- Flament Simon, S. C. (2021). *Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Escherichia coli and Clones Causing Extraintestinal Infections in Humans. Animals as Reservoir of High-Risk E. coli Clones Pathogenic for Humans*.
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., & De la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 35, Issue 5, pp. 936–956). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00291.x>
- Guennadi, S., Danièle, J.-P., & Richard, D. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>
- Guyer, M. S., Reed, R. R., Steitz, J. A., & Low, K. B. (1981). Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as $\gamma\delta$. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 45, 135–140.
- He, D., Zhu, Y., Li, R., Pan, Y., Liu, J., Yuan, L., & Hu, G. (2019). Emergence of a hybrid plasmid derived from IncN1-F33:A–:B– and mcr-1-bearing plasmids mediated by IS26. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3184–3189. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz327>
- Hülter, N., Ilhan, J., Wein, T., Kadibalban, A. S., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2017). An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 38, pp. 74–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.001>
- Ilangovan, A., Kay, C. W. M., Roier, S., El Mkami, H., Salvadori, E., Zechner, E. L., Zanetti, G., & Waksman, G. (2017). Cryo-EM Structure of a Relaxase Reveals the Molecular Basis of DNA Unwinding during Bacterial Conjugation. *Cell*, 169(4), 708–721.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.010>
- Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., & Philippon, A. (1988). Extended Broad-Spectrum β -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer β -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4), 867–878. <https://doi.org/10.1093/clinids/10.4.867>
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., & Smith, K. E. (2003). Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2161–2168. <https://doi.org/10.1128/aac.47.7.2161-2168.2003>
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host Characteristics and Bacterial Traits Predict Experimental Virulence for *Escherichia coli* Bloodstream Isolates From Patients With Urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), ofv083. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv083>
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary Jr, J. C., & Stell, A. L. (2000). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroNE, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5), 3040–3047.

- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. (1997). Characteristics and prevalence within serogroup O4 of a J96-like clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* O4: H5 containing the class I and class III alleles of papG. *Infection and Immunity*, *65*(6), 2153–2159.
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(1), 261–272.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(12), 3987–3996. <https://doi.org/10.1128/jcm.00816-08>
- Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J.-A., Klugman, K., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *The Lancet*, *387*(10014), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2)
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1189-1193.1992>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: The thin line between commensalism and pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *358*, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Li, D., Elankumaran, P., Kudinha, T., Kidsley, A. K., Trott, D. J., Jarocki, V. M., & Djordjevic, S. P. (2023). Dominance of *Escherichia coli* sequence types ST73, ST95, ST127 and ST131 in Australian urine isolates: a genomic analysis of antimicrobial resistance and virulence linked to F plasmids. *Microbial Genomics*, *9*(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001068>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahérault, A.-C., Kemble, H., Magnan, M., Gachet, B., Roche, D., Le Nagard, H., Tenaillon, O., Denamur, E., Branger, C., & Landraud, L. (2019). Advantage of the F2: A1: B-IncF pandemic plasmid over IncC plasmids in in vitro acquisition and evolution of bla CTX-M gene-bearing plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(10), 10–1128.
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Meek, R. W., Vyas, H., & Piddock, L. J. V. (2015). Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? *PLOS Biology*, *13*(10), e1002266-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002266>
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., & Blanco, M. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, *167*(3–4), 506–512.
- Morales, C., Lee, M. D., Hofacre, C., & Maurer, J. J. (2004). Detection of a Novel Virulence Gene and a Salmonella Virulence Homologue Among *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, *1*(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.160>
- Morens, D. M., Folkers, G. K., & Fauci, A. S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, *430*(6996), 242–249. <https://doi.org/10.1038/nature02759>

- Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4(5), 257–271.
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.142>
- Nolan, L. K., Li, G., & Logue, C. M. (2015). Origin and Dissemination of Antimicrobial Resistance among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0007-2012>
- Orlek, A., Anjum, M. F., Mather, A. E., Stoesser, N., & Walker, A. S. (2023). Factors associated with plasmid antibiotic resistance gene carriage revealed using large-scale multivariable analysis. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29530-y>
- Orlek, A., Phan, H., Sheppard, A. E., Doumith, M., Ellington, M., Peto, T., Crook, D., Walker, A. S., Woodford, N., Anjum, M. F., & Stoesser, N. (2017). Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. *Plasmid*, 91, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.002>
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Sarah Walker, A., Phan, H., & Sheppard, A. E. (2017). Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00182>
- Ørskov, F., & Ørskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(7), 699–704. <https://doi.org/10.1139/m92-115>
- Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 416, pp. 181–211). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_110
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue JAN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>
- Pitout, J. D. D., & DeVinney, R. (2017). *Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10609.1>
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Chen, L., DeVinney, R., & Matsumura, Y. (2022). *Escherichia coli* ST1193: Following in the Footsteps of *E. coli* ST131. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 66, Issue 7). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/aac.00511-22>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Rasheed, J. K., Jay, C., Metchock, B., Berkowitz, F., Weigel, L., Crellin, J., Steward, C., Hill, B., Medeiros, A. A., & Tenover, F. C. (1997). Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3), 647–653.
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 8(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020>

- Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 347–359). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Saladin, M., Cao, V. T. B., Lambert, T., Donay, J.-L., Herrmann, J.-L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 161–168.
- San Millan, A., & MacLean, R. C. (2017). Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology Spectrum*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0016-2017>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Servin, A. L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 264–292. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.264-292.2005>
- Servin, A. L. (2014). Pathogenesis of Human Diffusely Adhering *Escherichia coli* Expressing Afa/Dr Adhesins (Afa/Dr DAEC): Current Insights and Future Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 823–869. <https://doi.org/10.1128/cmr.00036-14>
- Shin, J., & Ko, K. S. (2015). Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of *Escherichia coli* ST131 isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.012>
- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., & Mirelis, B. (2000). Salmonella enterica serovar Virchow with CTX-M-like β -lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4676–4678.
- Slater, F. R., Bailey, M. J., Tett, A. J., & Turner, S. L. (2008). Progress towards understanding the fate of plasmids in bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00505.x>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/mubr.00020-10>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & T, M. H. L. (2012). *Escherichia coli* Isolates That Carry vat, fyuA, chuA, and yfcV Efficiently Colonize the Urinary Tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/iai.00752-12>
- Stapleton, P., Wu, P. J., King, A., Shannon, K., French, G., & Phillips, I. (1995). Incidence and mechanisms of resistance to the combination of amoxicillin and clavulanic acid in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), 2478–2483. <https://doi.org/10.1128/aac.39.11.2478>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales

data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)

- Veldman, K., Kant, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wit, B., & Mevius, D. (2014). Enterobacteriaceae resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 72–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.014>
- Vigil, P. D., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Hooton, T. M., Hodges, A. P., He, Y., & Mobley, H. L. T. (2011). Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract. *MBio*, 2(3), 10–1128.
- Villa, L., & Carattoli, A. (2020). Plasmid Typing and Classification. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2075, pp. 309–321). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_22
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518–2529. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq347>
- Wang, H., Xu, Q., Chen, K., Chan, B. K. W., Ye, L., Yang, X., Xie, M., Liu, X., Ni, H., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2022). A Siderophore-Encoding Plasmid Encodes High-Level Virulence in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02528-21>
- Weissman, S. J., Chattopadhyay, S., Aprikian, P., Obata-Yasuoka, M., Yarova-Yarovaya, Y., Stapleton, A., Ba-Thein, W., Dykhuizen, D., Johnson, J. R., & Sokurenko, E. V. (2006). Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 59(3), 975–988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04985.x>
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.03.007>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., & Ochman, H. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151.
- World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*.
- Xie, M., Li, R., Liu, Z., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2018). Recombination of plasmids in a carbapenem-resistant NDM-5-producing clinical *Escherichia coli* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1230–1234. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx540>
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>

Anexos

Tabla S1. *Primers* usados y condiciones de trabajo escogidas para la detección de genes codificantes de factores de virulencia (FV).

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL) para [20 μM]	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Referencia
<i>kpsM II</i>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	0,5	272	64	(J. R. Johnson & Stell, 2000)
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
<i>iucD</i>	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	0,5	602	64	(Yamamoto et al., 1995)
	Aer r	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG				
<i>iutA</i>	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	0,5	301		(J. R. Johnson et al., 1997)
	Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG				
<i>iroN</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	0,3	665	66	(J. R. Johnson et al., 2000)
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG				
<i>hlyA</i>	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	0,3	1177	64	(Yamamoto et al., 1995)
	hly r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA				
<i>hlyF</i>	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAA	0,5	444	60	(Morales et al., 2004)
	Reverse	TTTGCGGTTTAGGCATTCC				
<i>tsh</i>	tsh03	GGTGGTGCCTGGAGTGG	0,5	640	62	(Dozois et al., 2000)
	tsh15	AGTCCAGCGTGATAGTGG				
<i>chuA</i>	ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	1	288	58	(Clermont et al., 2013)
	ChuA.2b	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				
<i>PapC</i>	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0,5	205	60	(J. R. Johnson et al., 2015)
	Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA				
<i>PapEF</i>	PapEF F	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	0,5	336	62	(Yamamoto et al., 1995)
	PapEF R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA				
<i>Sfa/focDE</i>	Sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	0,5	410	64	(Le Bouguenec et al., 1992)
	Sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA				
<i>Afa/draBC</i>	afa1	GCTGGGAGCAAACTGATAACTCTC	0,5	750		
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG				

Tabla S2. Condiciones PCR multiplex para los genes *vat*, *fyuA* y *yfcV*.

Diana	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL) para [20 μM]	Tamaño (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Referencia
<i>vat</i>	Forward	TCAGGACACGTTTCAGGCATTCACT	0,5	1100	66	(Vigil et al., 2011)
	Reverse	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
<i>fyuA</i>	Forward	GTAACAATCTTCCCCTCGGCAT	0,5	850	66	(Vigil et al., 2011)
	Reverse	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
<i>yfcV</i>	Forward	ACATGGAGACCACGTTCAAC	0,5	292	66	(Spurbeck et al., 2012)
	Reverse	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG				

Tabla S3. *Primers* usados y condiciones de trabajo escogidas para la detección de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL) para [10μM]	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento	Referencia
<i>blaCTX-M-grupo 9</i>	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	0,5	856	64	(Simarro et al., 2000)
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC				
<i>blaCTX-M-grupo I</i>	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	1	863	60	(Saladin et al., 2002)
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC				
<i>blaCTX</i>	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	1	542	55	(Mora et al., 2013)
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC				
<i>blaTEM</i>	TEM-1F	ATGAGTATTC AACATTCCG	1	868	58	(Rasheed et al., 1997)
	TEM-1R	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
<i>blSHV</i>	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC	0,5	879	64	(Mora et al., 2013)
	SHV-R2	CCCGGCGATTGCTGATTTCGC				

Tabla S4. Condiciones óptimas de los *primers* para identificar los plásmidos tras la puesta a punto.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL) para [10μM]	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) Anillamiento
MOBF12	F12-f	agcgacggcaattattacaccgacaaggayaaytaya	1	234	55
	F1-r	actttggcgcgggaraabtgsagrtc			
MOBP13	P131-f	aaccacgctgcaargayccvgt	1	180	58
	P1-r	agcgatgtggatgtgaaggtrtengtrtc			
MOBP3	P3-f	ccgtgagccaaatcacagaaatkrbtt	1	177	55
	P3-r	cgaagccaacatgaacatghggatkhtc			
MOBP51	P51-f	taccacgacctatgcaaraartayac	1	167	55
	P5-r	ccctgtcctggtgytsnaccca			
MOBQ12	Q12-f	ctggaatatactgaacacgnaayatgc	1	341	55
	Q12-r	atccttggtgtagcacgttraarwaytg			
MOBH11	H11-f	ccggcgtcggagaaycaycayca	1	207	60
	H11-r	aaggctgtataccttyckgcrtrtg			
IncFIA	FIA FW	ccatgctggttctagagaagggtg	1	462	60
	FIA RV	gtatatccttactggttcgcag			
IncFIB	FIB FW	tctgttattctttactgtccac	1	682	60
	FIB RV	ctcccgtgcttcaggcatt			
IncFII	FII FW	ctgatcgttaaggaatctt	1	258–262	55
	FII RV	cacaccatcctgcactta			

La referencia bibliográfica de todos estos *primers* es (Villa & Carattoli, 2020).