



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

D.^a Natalia Farto Pastoriza

**DELECIÓN DE GENES DEL
RESISTOMA SECUNDARIO DE
ESCHERICHIA COLI DE ORIGEN
ANIMAL Y/O HUMANA RESISTENTE
A CEFOTAXIMA**

Trabajo Fin de Grado

Junio 2025

Licencia

Esta obra pertenece a Natalia Farto Pastoriza, 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/>.



Financiación

La autora, Natalia Farto Pastoriza, agradece al Campus Terra por su Ayuda de Iniciación a la Investigación 2024-2025 convocada por la “*Resolución reitoral 07 de febreiro 2025, da Universidade de Santiago de Compostela, pola que se establecen as bases reguladoras e se convocan bolsas para a iniciación á investigación no marco do Convenio de Colaboración entre a USC e a Consellería de Educación, Ciencia, Universidades e Formación Profesional, polo que se regula o Campus de Especialización Campus Terra*”.



ÍNDICE

RESUMEN	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
RESUMEN GRÁFICO	7
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. La resistencia a los antimicrobianos (RAM)	10
1.1.1. Principales mecanismos de resistencia bacteriana	11
1.1.1.1. Alteración o inactivación del antimicrobiano	12
1.1.1.2. Modificación de la diana del antimicrobiano	12
1.1.1.3. Mecanismos de eflujo	12
1.1.1.4. Limitación de la permeabilidad antimicrobiana en las células bacterianas.....	13
1.1.1.5. Formación de biofilm.....	13
1.2. Principales grupos de antibióticos y betalactámicos	14
1.2.1. Betalactámicos	15
1.2.1.1. Cefalosporinas: cefotaxima.....	15
1.3. Mecanismos de resistencia a betalactámicos	16
1.4. <i>Escherichia coli</i>	17
1.4.1. Clasificación de <i>E.coli</i>	18
1.5. El resistoma secundario y su estudio mediante TraDIS	19
1.5.1. Técnicas ómicas en el estudio de la resistencia, TraDIS y validación de los genes	19
1.5.1.1. Genes implicados en resistencia no clásica: el resistoma secundario	20
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1. Cepas bacterianas, crecimiento y mantenimiento	24
3.2. Caracterización fenotípica de la resistencia antimicrobiana (RAM)	25
3.2.1. Preparación del inóculo.....	25
3.2.2. Inoculación de las placas.....	25
3.2.3. Dispensación de los discos.....	25
3.2.4. Lectura e interpretación de los resultados	25
3.2.5. Identificación de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)	26
3.2.5.1. Dispensación de los discos.....	27
3.2.5.2. Lectura e interpretación de los resultados	27
3.2.6. Ensayo de discos combinados con inhibidor de B-lactamasas: determinación de producción de enzimas tipo ApmC.	27

3.2.6.1.	Dispensación de los discos.....	27
3.2.6.2.	Lectura e interpretación de los resultados.....	27
3.3.	Análisis de genes de virulencia y resistencia en las cepas objeto de estudio.....	28
3.3.1.	Mezcla de reacción.....	28
3.3.2.	Amplificación del ADN.....	28
3.3.3.	Lectura de los resultados.....	28
3.4.	Mutagénesis basada en el sistema de recombinación Lambda Red.....	29
3.4.1.	Extracción del ADN plasmídico.....	29
3.4.1.1.	Amplificación del fragmento empleado en la mutagénesis.....	29
3.4.1.2.	Purificación del ADN digerido.....	30
3.4.2.	Obtención de células bacterianas competentes.....	31
3.4.3.	Deleción génica mediante Lambd red.....	31
3.4.3.1.	Lectura de resultados.....	33
3.5.	Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en las cepas objeto de estudio.....	33
3.5.1.	Preparación de un stock de cefotaxima.....	34
3.5.2.	Preparación del inóculo.....	34
3.5.3.	Determinación de la MIC.....	34
3.5.4.	Recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs).....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1.	Caracterización fenotípica de las cepas objeto de estudio.....	37
4.1.1.	Crecimiento y morfología de las cepas.....	37
4.1.2.	Perfil de resistencia a antimicrobianos.....	37
4.2.	Caracterización genotípica de las cepas objeto de estudio.....	39
4.2.1.	Perfil de virulencia y función de los genes analizados.....	39
4.2.2.	Perfil de resistencia: detección de genes <i>bla_{BLEE}</i>	40
4.3.	Obtención de mutantes carentes del gen <i>mnmA</i> en las cepas objeto de estudio.....	41
4.4.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en las cepas silvestres y mutantes.....	41
4.5.	Análisis de la cinética de muerte bacteriana mediante “Time-Kill Assay”.....	43
5.	CONCLUSIONES.....	44
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
7.	ANEXOS.....	47
7.1.	Compilación de primers.....	47
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	49

RESUMEN

Deleción de genes del resistoma secundario de *Escherichia coli* de origen animal y/o humana resistente a cefotaxima

La rápida diseminación de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial constituye una de las principales amenazas para la salud pública actual. La escasez de tratamientos eficaces frente a infecciones causadas por bacterias multirresistentes (MDR) subraya la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y profilácticas. En este contexto, la OMS ha clasificado a las Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación como “prioridad crítica”, debido a su potencial para causar infecciones graves y a la limitación de terapias efectivas para combatirlas.

Este estudio investiga el papel del gen *mnmA*, perteneciente al resistoma secundario (RS) de *Escherichia coli*, frente a la cefotaxima (CTX), en cepas clínicas de *E.coli* resistentes a dicho antibiótico, dado que las proteínas codificadas por genes de RS podrían representar dianas para fármacos adyuvantes. Mediante mutagénesis dirigida, se delecionó el gen *mnmA* sustituyéndolo por una casete de resistencia a Kan codificada en el plásmido pKD4. En las colonias mutantes obtenidas se determinó el perfil de resistencia a CTX mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y se compararon con los valores obtenidos en las cepas silvestres correspondientes. Adicionalmente, se evaluó si la deleción del gen *mnmA* afectaba el crecimiento de las cepas en presencia de CTX —concentración aproximada de 1/2 de la MIC determinada para la cepa silvestre— y, por tanto, su susceptibilidad al antibiótico, mediante un ensayo “Time-Kill Assay”.

Los resultados evidenciaron que *mnmA* forma parte del RS de *E.coli* frente a CTX, ya que su deleción aumenta la susceptibilidad bacteriana al antibiótico observando una disminución de la MIC de CTX en las cepas mutantes (entre 4-8 veces) respecto a las cepas silvestres correspondientes. Además, el ensayo “Time-Kill Assay” en presencia de CTX mostró una reducción gradual de las UFC/mL a lo largo del tiempo en las cepas mutantes en comparación con las cepas silvestres.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistoma secundario, cefotaxima, RAM, mutagénesis, MIC, Time-Kill Assay.

RESUMO

Deleción de xenes do resistoma secundario de *Escherichia coli* de orixe animal e/ou humano resistente a cefotaxima

A rápida diseminación da resistencia aos antimicrobianos a nivel mundial constitúe unha das principais ameazas para a saúde pública actual. A escaseza de tratamentos eficaces fronte a infeccións causadas por bacterias multirresistentes (MDR) subliña a necesidade de desenvolver novas estratexias terapéuticas e profilácticas. Neste contexto, a OMS clasificou ás Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de terceira xeración como "prioridade crítica", debido ao seu potencial para causar infeccións graves e á limitación de terapias efectivas para combatelas.

Este estudo investiga o papel do xene *mnmA*, pertencente ao resistoma secundario (RS) de *Escherichia coli*, fronte á cefotaxima (CTX), en cepas clínicas de *E.coli* resistentes ao dito antibiótico, dado que as proteínas codificadas por xenes do RS poderían representar dianas para fármacos adxuvantes. Mediante mutaxénese dirixida, delecionouse o xene *mnmA* substituíndoo por unha casete de resistencia a Kan codificada no plásmido pKD4. Nas colonias mutantes obtidas determinouse o perfil de resistencia a CTX mediante a análise da concentración mínima inhibitoria (MIC) e comparáronse cos valores obtidos nas cepas silvestres correspondentes. Adicionalmente, avalíouse se a deleción do xene *mnmA* afectaba ao crecemento das cepas en presenza de CTX—concentración aproximada de 1/2 da MIC determinada para a cepa silvestre—e, por tanto, a súa susceptibilidade ao antibiótico, mediante un ensaio "Time-Kill Assay".

Os resultados evidenciaron que *mnmA* forma parte do RS de *E.coli* fronte a CTX, xa que a súa deleción aumenta a susceptibilidade bacteriana ao antibiótico observando unha diminución da MIC de CTX nas cepas mutantes (entre 4-8 veces) respecto ás cepas silvestres correspondentes. Ademais, o ensaio "Time-Kill Assay" en presenza de CTX mostrou unha redución gradual das UFC/mL ao longo do tempo nas cepas mutantes en comparación coas cepas silvestres.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistoma secundario, cefotaxima, RAM, mutaxénese, MIC, Time-Kill Assay.

ABSTRACT

Secondary resistome gene deletion of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* of animal and/or human origin

The rapid global spread of antimicrobial resistance is one of the main threats to current public health. The scarcity of effective treatments for infections caused by multidrug-resistant bacteria (MDR) underscores the urgent need to develop new therapeutic and prophylactic strategies. In this context, the WHO has classified third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* as a "critical priority", due to their potential to cause serious infections and the limited effective therapies available to combat them.

This study investigates the role of the *mmmA* gene, belonging to the secondary resistome (RS) of *Escherichia coli*, against cefotaxime (CTX) in clinical *E.coli* strains resistant to this antibiotic, since the proteins encoded by RS genes could represent targets for adjuvant drugs. Using site-directed mutagenesis, the *mmmA* gene was deleted and replaced by a Kan resistance cassette encoded on the pKD4 plasmid. The CTX resistance profile of the obtained mutant colonies was determined by the analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC) and compared with the values obtained in the corresponding wild-type strains. Additionally, we evaluated whether *mmmA* gene deletion affected the growth of the strains in the presence of CTX—at approximately 1/2 the wild-type strain's determined MIC—and, therefore, their susceptibility to the antibiotic, using a "Time-Kill Assay".

The results showed that *mmmA* is part of the RS of *E.coli* against CTX, as its deletion increases bacterial susceptibility to the antibiotic observing a decrease in CTX MIC in mutant strains (4-8-fold) compared to their corresponding wild-type strains. In addition, the "Time-Kill Assay" in the presence of CTX showed a gradual reduction in CFU/mL over time in the mutant strains compared to wild-type strains.

Keywords: *Escherichia coli*, secondary resistome, cefotaxime, AMR, mutagenesis, MIC, Time-Kill Assay.

RESUMEN GRÁFICO

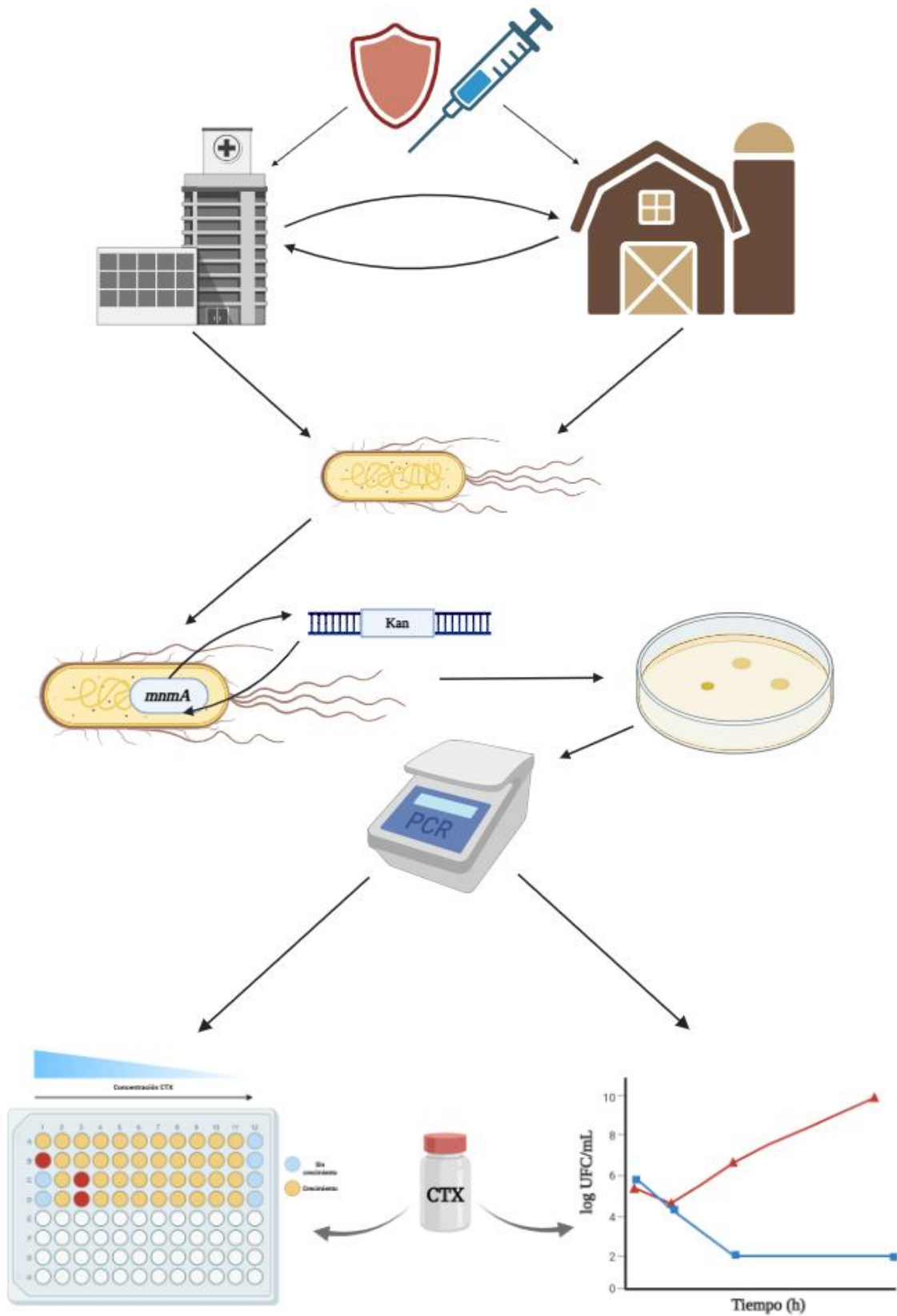


Figura 1. Resumen gráfico de “Delección de genes del resistoma secundario de *Escherichia coli* de origen animal y/o humana resistente a cefotaxima” (Creado con BioRender.com).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC (*ATP-binding cassette*): Casete de unión a ATP

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP: Ampicilina

APEC (*Avian Pathogenic Escherichia Coli*): *Escherichia coli* Patogénica Aviar

ARN: Ácido ribonucleico

BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido

CAT: Cloranfenicol Acetiltransferasa

CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*): Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

CTX: Cefotaxima

DDST (*Double Disc Synergy Test*): Prueba de Sinergia de Doble Disco

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*): Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*): Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

ExPEC (*Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli*): *Escherichia coli* Patógena Extraintestinal

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*): Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GEN: Gentamicina

ITU: Infección del Tracto Urinario

KAN: Kanamicina

LA: Luria Agar

LB: Luria Bertani

LPS: Lipopolisacáridos

MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusión*): Extrusión de Múltiples Fármacos y Compuestos Tóxicos

MDR (*Multidrug-Resistance*): Multirresistente

MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers*): Epilepsia Mioclónica con Fibras Rojas Rasgadas

MFS (*Major Facilitator Superfamily*): Superfamilia de Facilitadores Mayores

MH: Mueller-Hinton

- MIC** (*Minimum Inhibitory Concentration*): Concentración Mínima Inhibitoria
- ML**: MacConkey Lactosa
- MLST** (*Multilocus sequence typing*): Tipificación multilocus de secuencia
- mRNA** (*messenger RNA*): ARN mensajero
- NMEC** (*Neonatal Meningitis-causing Escherichia coli*): *Escherichia coli* causante de meningitis neonatal
- OD** (*Optical Density*): Densidad Óptica
- OMS**: Organización Mundial de la Salud
- OMSA**: Organización Mundial de Sanidad Animal
- PBP** (*Penicilin Binding Protein*): Proteína Ligadora de Penicilina
- PBS** (*Phosphate-Buffered Saline*): Solución Salina Tamponada con Fosfato
- PCR** (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa
- PNUMA**: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
- RAM**: Resistencia antimicrobiana
- RND** (*Resistance-Nodulation-Division*): Resistencia-Nodulación-División
- RS**: Resistoma secundario
- SMR** (*Small Multidrug Resistance*): Resistencia Pequeña a Múltiples Fármacos
- SOC** (*Super Optimal broth with Catabolite represión*): Caldo Súper Óptimo con represión Catabólica
- ST**: Secuencia tipo
- TraDIS** (*Transposon-Directed Insertion-Sequencing*)
- TSB** (*TrypticSoy Broth*): Caldo de triptona-soja
- tRNA** (*transference RNA*): ARN de transferencia
- UFC**: Unidades Formadoras de Colonias
- UPEC** (*Uropathogenic Escherichia Coli*): *Escherichia coli* uropatógena
- VIH**: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

Como bien es sabido, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) supone en la actualidad una crisis sanitaria mundial emergente con un impacto significativo en la salud humana, la salud animal y el medio ambiente, causando grandes pérdidas en la economía global debidas a enfermedades y pandemias. Solo en Europa, se ha estimado que la RAM se ha correlacionado con un gasto de más de nueve mil millones de euros al año y, de acuerdo con el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), más de 35.000 personas mueren anualmente en Europa como consecuencia directa de una infección resistente (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024);(Llor & Bjerrum, 2014).

Frente a esta creciente amenaza global, surge la necesidad de adoptar un enfoque integrador que permita comprender y afrontar los factores interrelacionados que contribuyen a la propagación de la RAM. Las conexiones entre la salud humana, animal y ambiental se articulan en el enfoque *One Health*, cuya procedencia se origina en la alianza cuatripartita, integrada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). Bajo la perspectiva de una sola salud, se pretende ahondar en la colaboración de diferentes sistemas y disciplinas, estrechando los vínculos existentes entre ellos, para abordar los complejos retos de salud a los que se enfrenta nuestra sociedad actual (World Health Organization, 2023).

1.1. La resistencia a los antimicrobianos (RAM)

Los antimicrobianos constituyen un grupo de sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas utilizadas para combatir infecciones causadas por diferentes tipos de microorganismos, como bacterias, hongos, parásitos y virus, según su espectro de actividad. En el caso específico de los antimicrobianos antibacterianos, estos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas, que ejercen una acción letal sobre las bacterias, y bacteriostáticos, que inhiben transitoriamente su crecimiento (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 marcó el inicio de una “edad dorada” en la Microbiología, que alcanzó su punto máximo a mediados de la década de los 50. Desde entonces, aunque se han seguido desarrollando antibióticos, el ritmo de descubrimiento de nuevas clases ha disminuido progresivamente, mientras que la evolución de la resistencia a los antimicrobianos en numerosos patógenos ha avanzado, dando lugar a la actual crisis de resistencia (Hutchings *et al.*, 2019).

La RAM se define como la capacidad, intrínseca o adquirida, que poseen los microorganismos para resistir la acción de los antibióticos, eludiendo los mecanismos destinados a su eliminación. Aunque se dispone de una amplia variedad de agentes antimicrobianos, se ha

documentado resistencia frente a todos ellos, la cual suele emerger poco después de la aprobación de un nuevo fármaco para su uso clínico. Esta preocupante situación llevó a la OMS a poner en marcha, en 2015, un Plan de Acción Mundial contra la resistencia a los antimicrobianos (Reygaert, 2018). La propagación de este fenómeno se ve favorecida por el uso inadecuado y excesivo de estos compuestos en diversos ámbitos, como la medicina humana, la medicina veterinaria y la agricultura. Además, factores biológicos como las mutaciones, la evolución bacteriana y la transmisión horizontal de genes de resistencia contribuyen igualmente a su diseminación (Dadgostar, 2019).

1.1.1. Principales mecanismos de resistencia bacteriana

Cuando se habla de bacterias resistentes a antimicrobianos, es importante diferenciar entre resistencia y persistencia. La resistencia implica que una bacteria posee mecanismos que le permiten sobrevivir a la acción de un agente antimicrobiano, y esta capacidad se transmite a toda su descendencia (salvo que se produzcan mutaciones adicionales). En cambio, la persistencia se debe a la presencia de un subgrupo de células dentro de una población bacteriana que entra en un estado de latencia, en el cual son tolerantes a los antibióticos debido a su escasa o nula actividad metabólica (Reygaert, 2018).

Las bacterias pueden poseer mecanismos de resistencia naturales o adquiridos. La resistencia natural puede ser intrínseca, cuando es inherente a la estructura y propiedades del microorganismo, independientemente de exposiciones previas a antibióticos, o inducible, si los genes de resistencia se expresan únicamente ante la exposición a un antibiótico. La resistencia adquirida surge por la adquisición de material genético de resistencia a través de procesos de transferencia horizontal de genes (transformación, transposición y conjugación) o por mutaciones en el ADN cromosómico bacteriano.

Constantemente se describen nuevos mecanismos de resistencia; algunos de los principales mecanismos de resistencia son (Reygaert, 2018):

- Alteración o inactivación enzimática del antimicrobiano
- Modificación del sitio diana del antimicrobiano
- Mecanismos de eflujo activo
- Limitación de la permeabilidad antimicrobiana en las células bacterianas
- Formación de *biofilm*

Existen diferencias en los mecanismos de resistencia utilizados por bacterias Gram-negativas en comparación con las bacterias Gram-positivas, principalmente debido a las diferencias estructurales que presentan. En las bacterias Gram-positivas, la ausencia de una membrana

externa de lipopolisacáridos dificulta su capacidad para limitar el paso del antimicrobiano al interior celular, y además carecen de ciertos tipos de sistemas de eflujo que sí están presentes en bacterias Gram-negativas (Reygaert, 2018).

1.1.1.1. Alteración o inactivación del antimicrobiano

Numerosas bacterias sintetizan enzimas capaces de inactivar o modificar irreversiblemente la estructura del antimicrobiano antes de que este alcance su diana en el interior celular, anulando así su acción. Los mecanismos enzimáticos de resistencia antimicrobiana incluyen degradación del fármaco, hidrólisis, transferencia de grupos químicos, normalmente grupos acetilo, fosforilo y adenilo, y procesos redox (Reygaert, 2018);(Varela *et al.*, 2021).

Entre las principales enzimas inactivadoras se encuentran las betalactamasas, que hidrolizan el anillo betalactámico de penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, las enzimas aminoglucósido-modificadoras, que modifican aminoglucósidos a través de acetilación, fosforilación y adenilación, las cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) y enzimas inactivadoras de macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (Santajit & Indrawattana, 2016).

1.1.1.2. Modificación de la diana del antimicrobiano

Existen múltiples componentes en la célula bacteriana que pueden actuar como diana de agentes antimicrobianos. Una estrategia común que las bacterias utilizan para desarrollar resistencia a estos compuestos es evitar la acción del antibiótico interfiriendo con su sitio objetivo.

Mediante la alteración del sitio específico de unión del antibiótico dentro de la bacteria se puede conseguir reducir o anular la eficacia de un antimicrobiano sin afectar la función esencial de dicha diana en el microorganismo. Las bacterias lo consiguen mediante mutaciones puntuales en genes codificadores de la diana objetivo, modificaciones postraduccionales o reemplazo completo de la diana original (Martínez & Alonso, 2016).

1.1.1.3. Mecanismos de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana que actúan como mecanismo de transporte activo permitiendo que las bacterias expulsen una amplia variedad de moléculas al exterior celular, incluidos los antibióticos. Este flujo reduce la concentración intracelular de antibióticos, lo que permite que las bacterias sobrevivan a concentraciones elevadas de los mismos. En muchas bacterias patógenas, especialmente Gram-negativas, la sobreexpresión de bombas de eflujo puede causar niveles clínicamente relevantes de resistencia a los antibióticos (Blair *et al.*, 2014).

Estos sistemas son normalmente codificados por genes cromosómicos, algunos de los cuales se expresan constitutivamente, mientras que otros son inducidos por estímulos ambientales o la presencia de un sustrato adecuado (Reygaert, 2018). Además, ciertos genes asociados a bombas

de eflujo pueden encontrarse en plásmidos, lo que facilita su diseminación entre cepas bacterianas (Kumar & Schweizer, 2005).

Aunque muchas de estas bombas son específicas de un fármaco, existen otros sistemas capaces de expulsar múltiples agentes antimicrobianos, contribuyendo de este modo de forma significativa a la resistencia multifármaco (MDR), tanto intrínseca como adquirida (Blair *et al.*, 2014).

En la actualidad, las bombas de eflujo se clasifican en cinco familias en base a su estructura y fuente de energía: la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette), la familia de transportadores MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusión), la familia de transportadores SMR (Small Multidrug Resistance), la familia de transportadores MFS (Major Facilitator Superfamily) y la familia de transportadores RND (Resistance-Nodulation-Division) (Reygaert, 2018); (Santajit & Indrawattana, 2016).

1.1.1.4. Limitación de la permeabilidad antimicrobiana en las células bacterianas

Un mecanismo importante de resistencia antimicrobiana es la prevención de la entrada de agentes antimicrobianos al interior celular. Este mecanismo involucra la reducción de la permeabilidad de la pared celular a la entrada de estos agentes.

La estructura de la membrana externa de lipopolisacáridos en bacterias Gram-negativas actúa como una barrera que limita la entrada de ciertos tipos de moléculas, lo que proporciona un sistema de resistencia innato frente algunos grupos de antimicrobianos. En las bacterias Gram-positivas, que no poseen membrana externa, la restricción del acceso de fármacos no constituye un mecanismo de resistencia a los antimicrobianos relevante (Reygaert, 2018).

Otro mecanismo molecular que confiere resistencia mediante la reducción de la permeabilidad involucra a las porinas, proteínas integrales de la membrana externa que forman canales acuosos en forma de poro, permitiendo el paso selectivo de moléculas según su tamaño y carga. Normalmente, estas porinas son altamente selectivas, impidiendo el paso de muchos agentes antimicrobianos; sin embargo, en el caso de porinas no selectivas, estas pueden ser eliminadas de la membrana o sufrir alteraciones funcionales debido a mutaciones. Además, las porinas permisivas pueden ser reguladas por moléculas bloqueadoras de canales o por moduladores antisentido de ARN (Varela *et al.*, 2021).

1.1.1.5. Formación de biofilm

Los *biofilms* o biopelículas son comunidades de microorganismos que viven adheridas en superficies bióticas o abióticas, inmersas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producidas por los propios microorganismos. Estas biopelículas pueden estar conformadas por un organismo predominante o pueden estar compuestas por una amplia variedad de especies, como

ocurre en la comunidad microbiana que conforma la flora normal del intestino (Rabin *et al.*, 2015).

La matriz extracelular de las biopelículas juega un papel importante en la resistencia antimicrobiana actuando como escudo mecánico y bioquímico, generando condiciones microambientales -baja disponibilidad de oxígeno y agua, pH bajo y alta concentración de dióxido de carbono- que atenúan la actividad de los fármacos convencionales. Adicionalmente, la consistencia espesa y pegajosa de la matriz de la biopelícula, que contiene polisacáridos, proteínas y ADN de las bacterias residentes, dificulta el acceso de los agentes antimicrobianos a las bacterias, lo que requiere concentraciones mucho más elevadas de los medicamentos para que sean efectivos. Cabe destacar que, la proximidad celular dentro de la matriz de biopelícula podría facilitar la transferencia horizontal de genes, lo que incrementa el potencial de diseminación de la resistencia a los antimicrobianos entre las bacterias que conforman estas comunidades (Reygaert, 2018); (Santajit & Indrawattana, 2016).

1.2. Principales grupos de antibióticos y betalactámicos

Los antibióticos son agentes antimicrobianos que actúan sobre diferentes estructuras y procesos esenciales para la supervivencia y proliferación de las bacterias. Según el mecanismo de actividad antimicrobiana que presenten pueden clasificarse en varias familias. Las principales familias de antibióticos son los betalactámicos, los aminoglucósidos, las tetraciclinas, el cloranfenicol, las quinolonas, las sulfonamidas, el trimetoprim y las polimixinas (Hutchings *et al.*, 2019).

Tabla 1. Grupos de antimicrobianos en base a sus mecanismos de acción. Adaptada de (Reygaert, 2018).

Mecanismo de acción		Grupo antimicrobiano	
Inhibición de la síntesis de la pared celular		Betalactámicos	
		Glucopéptidos	
Despolarización de la membrana celular		Lipopéptidos	
Inhibición de la síntesis proteica	Unión a la subunidad 30S ribosomal	Aminoglucósidos	Tetraciclinas
	Unión a la subunidad 50S ribosomal	Cloranfenicol Lincosamidas Macrólidos Oxazolidinonas Streptograminas	

Tabla 1. Continuación

Mecanismo de acción	Grupo antimicrobiano	
Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas	Fluoroquinolonas
Inhibición de rutas metabólicas	Sulfonamidas	Trimetoprima

1.2.1. Betalactámicos

La familia de los betalactámicos es la familia de antimicrobianos más numerosa y ampliamente utilizada en la práctica clínica, debido a su alta eficacia y baja toxicidad. La presencia de un anillo betalactámico en su estructura determina tanto el mecanismo de acción como el principal mecanismo de resistencia (las betalactamasas) de esta gran familia de antibióticos. Esta estructura es fundamental para la inhibición de las enzimas bacterianas transpeptidasas o proteínas ligadoras de penicilina (PBP), involucradas en la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Al unirse de forma irreversible a estas enzimas, los betalactámicos interrumpen la formación de puentes peptídicos en el peptidoglicano, debilitando la pared celular y provocando la lisis bacteriana. Por este motivo, la acción de estos fármacos se considera bactericida. Durante la fase de crecimiento activo de la bacteria es cuando su efecto resulta más eficaz, ya que la síntesis de pared celular es constante. Los antibióticos que pertenecen a esta familia, penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, son tratamientos de elección para un amplio espectro de infecciones, como las infecciones respiratorias o las causadas por bacterias multirresistentes (Suárez & Gudiol, 2009).

1.2.1.1. Cefalosporinas: cefotaxima

La cefotaxima es un antibiótico betalactámico, perteneciente al grupo de las cefalosporinas de tercera generación. Presenta un amplio espectro de acción, actuando principalmente frente a bacterias Gram-negativas, como *E.coli*. Se caracteriza por presentar mayor estabilidad frente a la acción de las betalactamasas en comparación con las cefalosporinas de generaciones anteriores.

Ejerce su acción bactericida evitando la síntesis de la pared celular bacteriana, específicamente uniéndose a las PBPs, lo que impide la formación de la mureína, componente clave de la pared celular. Como resultado, se produce un debilitamiento de la pared bacteriana, resultando en lisis celular y muerte del microorganismo.

Actualmente, su uso se extiende al tratamiento de infecciones graves, tales como infecciones del tracto urinario, neumonías, meningitis o septicemias, causadas por bacterias sensibles. Su administración es parenteral debido a su baja absorción oral (Suárez & Gudiol, 2009). Además, se emplea para tratar infecciones resistentes a otras cefalosporinas o antibióticos más comunes (Papich, 2016).

1.3. Mecanismos de resistencia a betalactámicos

A pesar de su eficacia, el espectro antibacteriano de los betalactámicos se ve limitado por mecanismos de resistencia, principalmente la producción de betalactamasas por parte de algunos microorganismos. Las betalactamasas son enzimas producidas por bacterias, principalmente bacterias Gram-negativas y enterobacterias, y algunos hongos para defenderse de los antibióticos betalactámicos, y constituyen el mecanismo de resistencia adaptativo más importante frente a ellos. Estas enzimas hidrolizan el anillo betalactámico, desactivando las propiedades antimicrobianas de la molécula (Astocondor-Salazar, 2018).

En el año 1980, Ambler clasificó las betalactamasas en base a su estructura, estableciendo cuatro clases: A, B, C y D. Las betalactamasas de las clases A, C y D son serina-betalactamasas, mientras que las del grupo B son metalo-betalactamasas, que requieren zinc para su funcionamiento. Las más importantes son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las AmpC y las carbapenemasas (Martínez & Alonso, 2016).

Las BLEE, originalmente llamadas penicilinasas y cefalosporinasas, confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, entre las que se encuentra la cefotaxima, y aztreonam, y son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico. Actúan hidrolizando un sitio específico del anillo betalactámico, provocando la apertura de este, haciéndolo incapaz de unirse al PBP objetivo (Astocondor-Salazar, 2018);(Bush, 2018). Los genes de resistencia asociados son principalmente codificados por plásmidos, aunque algunos microorganismos producen betalactamasas cromosómicas, e incluyen enzimas de tipo SHV, TEM, CTX-M y OXA. Entre estas clases, la diseminación más amplia se ha detectado para la familia CTX-M, que comprende más de 190 variantes agrupadas en cinco clústeres genéticos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25) (Alobaidallah *et al.*, 2023). Las BLEE codificadas por genes plasmídicos pueden diseminarse fácilmente entre cepas bacterianas, facilitando la propagación de la resistencia antimicrobiana en humanos, animales y el medio ambiente. Además, la coexistencia de genes BLEE con otros determinantes de resistencia en plásmidos conjugativos favorece el desarrollo de bacterias multirresistentes.

Las betalactamasas de tipo AmpC codificadas de forma natural a nivel cromosómico en algunas especies bacterianas, conocidas bajo el acrónimo de AMPCES (AmpC-Producing *Enterobacteriaceae*). Confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de primera a tercera generación y aztreonam. A diferencia de las BLEE, no son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico (Astocondor-Salazar, 2018).

Las carbapenemasas, son las betalactamasas con mayor espectro de hidrólisis sobre los antibióticos betalactámicos, pues hidrolizan carbapenémicos, además de incluir a prácticamente todos los betalactámicos (Astocondor-Salazar, 2018);(Bush, 2018).

La resistencia a los antibióticos betalactámicos también puede estar mediada por bombas de eflujo que expulsan los antimicrobianos, evitando la interacción entre las PBPs y el fármaco, generalmente al modificar la capacidad del antibiótico para unirse a estas proteínas (Reygaert, 2018).

A pesar de contar con un amplio rango de mecanismos para combatir las infecciones bacterianas, la administración inadecuada de antimicrobianos ha contribuido al grave problema de resistencia que enfrentamos actualmente. En respuesta, las bacterias han desarrollado múltiples estrategias adaptativas, las cuales representan un desafío creciente para el tratamiento eficaz de estas infecciones (Reygaert, 2018).

1.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa con forma de bacilo miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Aunque se encuentra de forma natural en la microbiota intestinal humana y animal, se han descrito ciertas cepas patogénicas que, mediante procesos de patoadaptación, han adquirido factores específicos de virulencia que les permiten colonizar nuevos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades (Reid *et al.*, 2022). Estos factores de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos móviles pudiendo transferirse entre diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia. Solo aquellas combinaciones que ofrecen una ventaja adaptativa persisten en el tiempo, conformando patotipos específicos capaces de provocar infecciones en individuos sanos (Kaper *et al.*, 2004).

E.coli causante de infecciones fuera del tracto gastrointestinal (ExPEC) comprende cepas responsables de la mayoría de las infecciones extraintestinales en humanos a nivel mundial, incluyendo septicemias, meningitis neonatal, infecciones respiratorias y del tracto urinario. Estas cepas se caracterizan por la presencia de múltiples factores de virulencia que potencian su capacidad patogénica, tales como adhesinas, sideróforos, toxinas y mecanismos de evasión del sistema inmunitario (Manges *et al.*, 2019). ExPEC incluye los siguientes patotipos: *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E.coli* patógena aviar (APEC), cada uno asociado a un tipo específico de infección (Manges *et al.*, 2019). Las cepas UPEC son las principales causantes de infecciones del trato urinario (ITU) en humanos, incluyendo cistitis, pielonefritis y, en casos severos, urosepsis. Estos microorganismos poseen factores de virulencia especializados que facilitan la colonización del urotelio, como adhesinas (tipo P y 1), toxinas (hemolisinas, factor necrotizante citotóxico y proteasas) y mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped (Kaper *et al.*, 2004). El patotipo APEC incluye cepas patógenas que afectan principalmente a aves de corral, causando infecciones locales y sistémicas, agrupadas bajo el término de colibacilosis, una de las principales causas de morbilidad y pérdidas económicas en la industria avícola (Kathayat *et al.*, 2021). Su relevancia trasciende más allá del campo veterinario; estudios recientes han revelado una alta similitud genética de cepas APEC con ExPEC humanas, incluyendo UPEC y *E.coli* para

meningitis neonatal (NMEC). APEC posee genes de virulencia característicos de patotipos humanos y la detección de plásmidos ColV (colicina V) específicos de APEC en aislados de ExPEC humanos sugiere una posible transmisión zoonótica de APEC de aves de corral a humanos. Por lo tanto, APEC es considerado un patógeno zoonótico potencial transmitido por los alimentos, así como una fuente o reservorio de infecciones extraintestinales en humanos con gran importancia para la industria avícola y la salud pública (Kathayat *et al.*, 2021).

1.4.1. Clasificación de *E.coli*

Las cepas asociadas a los diferentes patotipos de *E. coli* tienden a constituir grupos clonales caracterizados por la expresión de antígenos compartidos O (lipopolisacáridos, LPS) y/o H (flagelares) compartidos, los cuales definen serogrupos y serotipos, respectivamente (Kaper *et al.*, 2004). Un grupo clonal se define como un conjunto de cepas genéticamente relacionadas que comparten un origen común. La identificación de estos grupos se realiza principalmente por tipificación multilocus (MLST), que asigna un “sequence type” (ST) a cada clon (Manges *et al.*, 2019). Entre los grupos clonales de *E.coli* de mayor relevancia epidemiológica y clínica se encuentran ST131, ST95 o ST11.

El linaje ST117, perteneciente al filogrupo G, constituye un grupo clonal de ExPEC, reconocido como un linaje emergente de APEC responsable de la colibacilosis aviar y de múltiples infecciones clínicas en humanos como ITU, septicemia y neumonía, resaltando así su potencial zoonótico (Xia *et al.*, 2022). Además, se han descrito varios casos de infecciones multirresistentes asociadas a este clon (Saidenberg *et al.*, 2024). Las bacterias de este grupo clonal portan una amplia variedad de factores de virulencia, como genes de adhesinas fimbriales de APEC/ExPEC, hemolisinas, sistemas de adquisición de hierro, y diversas toxinas, además regiones con alta similitud a islas de patogenicidad, lo que contribuye a su elevada virulencia y adaptabilidad. Frecuentemente, estas cepas también albergan plásmidos ColV, que transportan genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Mora *et al.*, 2012);(Saidenberg *et al.*, 2024);(Xia *et al.*, 2022). Por su parte, el linaje ST58 es un grupo clonal persistente de ExPEC, reportado en humanos, animales destinados a la producción alimentaria, vida silvestre y en diversos ambientes, lo que evidencia su amplia capacidad de adaptación, persistencia y diseminación a nivel mundial. A diferencia de otros linajes de ExPEC, ST58 pertenece al filogrupo B1, clásicamente asociado con cepas comensales no virulentas (Reid *et al.*, 2022); sin embargo, posee una notable capacidad para causar infecciones urinarias y evolucionar hacia cuadros graves como sepsis sanguínea. Se ha identificado en casos clínicos persistentes de infecciones del torrente sanguíneo en humanos y también ha sido aislado en animales de granja, como bovinos, aves de corral y cerdos (Reid *et al.*, 2022), siendo los alimentos una de las principales fuentes de transmisión de este clon. La evolución de ST58, mediante la adquisición de plásmidos ColV, ha incrementado su virulencia y resistencia, posicionándolo como un

importante clon uropatógeno de distribución global. Estos plásmidos codifican resistencia a múltiples clases de antimicrobianos, lo que resalta su relevancia en la evolución del linaje y su capacidad para causar infecciones graves, como la urosepsis (Kaper *et al.*, 2004);(Cundon *et al.*, 2018).

1.5. El resistoma secundario y su estudio mediante TraDIS

El término “resistoma” se refiere al conjunto de genes presentes en un microorganismo que confieren resistencia a los antimicrobianos (Kumar & Kumar, 2021). Este concepto ha adquirido una relevancia creciente con el desarrollo de las técnicas ómicas, las cuales no solo permiten identificar genes previamente caracterizados, sino también descubrir nuevos factores que podrían estar implicados en la resistencia (Dai & Shen, 2022).

Así, el resistoma no se restringe únicamente a genes que confieren resistencia de forma directa, sino que también comprende aquellos que, de manera indirecta, pueden contribuir a la resistencia a antimicrobianos. De esta manera, el resistoma se puede clasificar en primario y secundario en función de la evidencia existente acerca de su implicación en la resistencia. El resistoma primario compone aquellos genes cuyo papel en la resistencia ha sido claramente establecido, mientras que el “resistoma secundario” (RS) hace referencia a genes cromosómicos o plasmídicos no esenciales en condiciones normales, pero que podrían ser relevantes -e incluso indispensables- en presencia de concentraciones terapéuticas de estos fármacos, contribuyendo así a la supervivencia del microorganismo (Jana *et al.*, 2017). La identificación y estudio del papel de estos genes es fundamental para poder diseñar nuevas estrategias de tratamiento y profilaxis eficaces, orientadas a combatir la resistencia bacteriana (Alobaidallah *et al.*, 2023).

1.5.1. Técnicas ómicas en el estudio de la resistencia, TraDIS y validación de los genes

Desde el establecimiento de la primera tecnología de alto rendimiento, el *microarray* de ADN, las tecnologías para la exploración ómica se han desarrollado a pasos agigantados, ampliando significativamente nuestra capacidad para analizar la complejidad genética de los microorganismos. Bajo el término de “tecnologías ómicas” se define el grupo de disciplinas biológicas -como la genómica, transcriptómica, proteómica o metabolómica- cuyo objetivo es identificar, caracterizar y cuantificar biomoléculas y procesos moleculares que determinan la estructura, función y dinámica de células, tejidos y organismos. En conjunto, estas disciplinas contribuyen al conocimiento de los procesos que convierten el genotipo en fenotipo (Dai & Shen, 2022). El campo de las tecnologías ómicas, en constante evolución y expansión, ha permitido desentrañar los complejos mecanismos moleculares que subyacen a diversas manifestaciones fenotípicas, entre ellas la resistencia a los antimicrobianos (Dai & Shen, 2022).

TraDIS “Transposon-Directed Insertion-Sequencing” es una herramienta ómica que combina la mutagénesis mediada por transposones con la secuenciación de próxima generación,

permitiendo el análisis a escala genómica de las relaciones entre genes y fenotipos (Yibing *et al.*, 2024). Mediante la inserción aleatoria de un transposón en el genoma bacteriano, se genera una librería de mutantes con interrupciones en distintos genes distribuidos a lo largo del genoma (librería input). La librería input generada puede someterse a ensayos bajo condiciones específicas, lo que permite obtener una librería final (output) que refleja la selección de mutantes en dichas condiciones. La secuenciación del ADN extraído de ambas librerías utilizando tecnología Illumina permite mapear con alta resolución las ubicaciones de inserción del transposón en el genoma. Esto facilita la identificación de genes esenciales y condicionalmente esenciales, es decir, aquellos cuya función es indispensable solo bajo determinadas condiciones ambientales, como es la presencia de antimicrobianos (Yibing *et al.*, 2024).

No obstante, la identificación de genes candidatos mediante TraDIS no es suficiente para confirmar su implicación directa en los fenotipos de resistencia observados, y la función de los genes predichos debe de ser validada mediante estudios complementarios. En el año 2000, Datsenko *et al.* diseñaron un método de mutagénesis dirigida en *E. coli* basado en el sistema λ Red, que permite la delección de genes específicos. Este método permite la sustitución de un gen cromosómico específico por una casete de resistencia a antibióticos, utilizando un fragmento de ADN amplificado por PCR como plantilla para la recombinación homóloga. La recombinación entre estas regiones homólogas es facilitada por las proteínas del sistema λ -Red (γ , β , exo), expresadas a partir de un plásmido auxiliar. Esta técnica permite obtener mutantes de manera eficiente y precisa, facilitando el análisis funcional de genes implicados en resistencia antimicrobiana (Datsenko & Wanner, 2000).

1.5.1.1. Genes implicados en resistencia no clásica: el resistoma secundario

En un estudio realizado en 2017, Jana *et al.* emplearon la técnica TraDIS para identificar genes pertenecientes al RS en un clon epidémico multirresistente de *Klebsiella pneumoniae* (ST258). Además, evaluaron la contribución individual de genes seleccionados a la resistencia frente a tres antimicrobianos clínicamente relevantes: colistina, imipenem y ciprofloxacina (Jana *et al.*, 2017).

Posteriormente, Alobaidallah *et al.* basándose en este estudio, investigaron el RS de una cepa de *E. coli* de referencia CTX-positiva (resistencia codificada por el gen *blaCTXM-1* localizado en un plásmido introducido experimentalmente). Mediante mutagénesis basada en λ -Red, se deleccionaron genes de interés (incluyendo *dnaK*, *mnmA*, *rsgA*, *ybeD*, *cpxR* y *yafN*) y se validó su papel durante el tratamiento con CTX, observándose un aumento en la susceptibilidad bacteriana a este antibiótico en los mutantes obtenidos. Los productos codificados por estos genes podrían representar dianas potenciales para drogas adyuvantes de la cefotaxima, abriendo nuevas vías para

estrategias terapéuticas innovadoras y eficaces en la lucha contra la resistencia antimicrobiana (Alobaidallah *et al.*, 2023).

En este trabajo analizamos el gen *mnmA* (también denominado *asuE* o *trmU*), que codifica una tRNA tiourilidasa, una enzima involucrada en la modificación postraduccional de ciertos ARN de transferencia (tRNA). Específicamente, MnmA cataliza la adición de un grupo tiol en la posición 2 de la uridina 34 del bucle del tRNA (“*wobble position*”) en *E.coli* (Kambampati & Lauhon, 2003). El tRNA participa en la síntesis proteica al traducir los codones del ARN mensajero (mRNA) en los aminoácidos correspondientes durante el proceso de traducción en el ribosoma. En todos los organismos, el tRNA presenta diversas modificaciones postraduccionales que desempeñan un papel crucial en la biogénesis, el metabolismo, la estabilidad estructural y la funcionalidad de estas moléculas de RNA (Silke, 2024).

El azufre es fundamental para la estructura y función de múltiples componentes celulares en todos los organismos vivos. La modificación de nucleósidos mediante la incorporación de azufre es muy común en los tRNA, siendo frecuentes variantes como la 2-tiouridina (s^2U), 4-tiouridina (s^4U), 2-tiocitidina (s^2C) y 2-metiltioadenosina (ms^2A) (Shigi, 2014). Estas modificaciones desempeñan un papel esencial en la decodificación del código genético al estabilizar las interacciones correctas codón-anticodón durante la traducción (Urbonavičius *et al.*, 2001).

La modificación de la uridina en la posición 34 en algunos tRNA de bacterias y eucariotas es indispensable para diversas funciones bioquímicas del tRNA. Entre ellas, destaca su papel como sitio de reconocimiento para enzimas involucradas en la síntesis y carga de aminoácidos (Noma *et al.*, 2009);(Silke, 2024);(Kambampati & Lauhon, 2003). Asimismo, esta modificación se ha visto involucrada en procesos relevantes para la salud humana, actuando como elemento de reconocimiento en el tARN^{Lys,3} por la transcriptasa inversa del VIH (Isel *et al.*, 1999). Además, su deficiencia se ha relacionado con la mutación en un gen mitocondrial que codifica para tARN^{Lys} (A8344G), causante de la encefalomiopatía mitocondrial MERRF (epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas) (Kambampati & Lauhon, 2003);(Yasukawa *et al.*, 2000).

La formación de la 2-tiouridina requiere un sistema de transferencia de azufre, identificado por Suzuki *et al.*, que involucra la L-cisteína desulfurasa IscS y las proteínas TusA, TuscBCD, TusE y la propia MnmA. Este sistema moviliza el azufre desde el persulfuro unido a IscS hasta generar un persulfuro en TusE, que sirve como fuente de azufre para la tiolación de la U34 del ARN^t que se encuentra unido a MnmA (Ikeuchi *et al.*, 2006);(Numata *et al.*, 2006);(Silke, 2024).

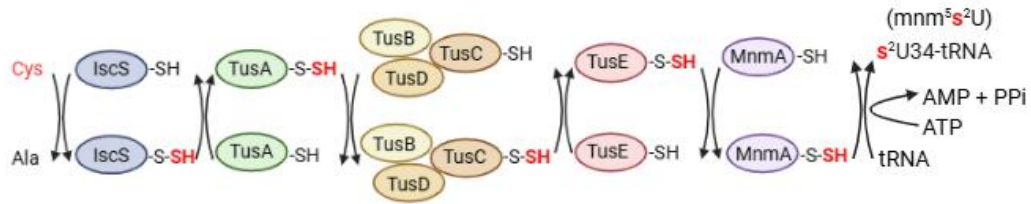


Figura 2. Ruta de biosíntesis de s²U34-tARN. Adaptada de (Shigi, 2014). En *E.coli*, las proteínas *Tus* transmiten el azufre persulfuro de *IscS* a una enzima modificadora, *MnmA*.

En el contexto del RS, *mnmA* ha sido identificado como “fitness gene” (i.e gen necesario para la supervivencia o crecimiento) durante el tratamiento combinado de CTX + GEN en la cepa de *E.coli* CTX-positiva mencionada (de referencia, modificada experimentalmente). Mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC), se demostró que la mutación del gen *mnmA* se asocia con una reducción de hasta 16 veces en comparación con la cepa silvestre, lo que refleja un aumento significativo en la susceptibilidad bacteriana al antibiótico (Alobaidallah *et al.*, 2023). Estos hallazgos sugieren que *mnmA* constituye un componente clave del RS a CTX, cuya alteración podría tener implicaciones terapéuticas relevantes en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Alobaidallah *et al.*, 2023).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Las cepas multirresistentes a los antibióticos constituyen actualmente una creciente amenaza para la salud humana y animal, con importantes repercusiones económicas. *E.coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, como la cefotaxima, ha sido clasificada por la OMS como una prioridad crítica para el desarrollo de nuevas terapias, lo que resalta la urgencia de encontrar tratamientos eficaces, especialmente considerando el potencial zoonótico de esta especie, que amplifica su relevancia en salud pública.

Este trabajo tiene como objetivo general abordar la problemática de la resistencia antimicrobiana mediante la evaluación del papel del gen *mnmA*, previamente identificado como esencial dentro del resistoma secundario de una cepa de *E.coli* de referencia modificada experimentalmente para conferir resistencia a CTX. Para ello, se deletionará y analizará el efecto de la eliminación de *mnmA* en dos cepas clínicas de *E.coli* portadoras “naturales” del gen *bla_{CTX-M-1}*, pertenecientes a los linajes ST117 (de origen aviar) y ST58 (aislada de sangre humana). Se parte de la hipótesis de que la mutación de *mnmA* incrementará la susceptibilidad bacteriana a CTX, como se observó en la cepa de referencia, lo que respaldaría su potencial como diana terapéutica frente a cepas patógenas de *E.coli* resistentes a CTX y otras cefalosporinas de tercera generación. Los objetivos específicos del trabajo incluyen:

- Análisis del del perfil de virulencia y resistencia de las cepas de estudio CTX-M-1 positivas.
- Mutagénesis del gen *mnmA* mediante la técnica “*lambd-red recombination system*” en las cepas de estudio.
- Evaluación y comparación de la susceptibilidad de las cepas silvestres y mutantes a CTX mediante el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC).
- Estudio de la supervivencia de las cepas mutantes respecto a sus correspondientes cepas silvestres mediante el ensayo “*Time kill assay*”
- Comparación de los resultados obtenidos con los previamente reportados para la cepa de referencia *E.coli* CTX-M-1-positiva y su mutante con delección del gen *mnmA*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas, crecimiento y mantenimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Cepas de *E.coli* y plásmidos usados en este estudio.

Cepa	Origen	Características	Referencia
MG1655	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia Coli</i> (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).	<i>E. coli</i> K-12 (cepa de referencia).	(Guyer <i>et al.</i> , 1981)
SB18101	Aislada de los intestinos de un pollo en un matadero de Dinamarca en 2018.	<i>E.coli</i> ST117 ESBL- <i>bla</i> _{CTXM-1} -positiva.	(Che <i>et al.</i> , 2023)
D66	Aislada de bacteriemia en el Hospital Beaujon de París en 2016.	<i>E.coli</i> -B1-CH4-32-ST58 ESBL- <i>bla</i> _{CTXM-1} -positiva.	(Flament-Simon <i>et al.</i> , 2020)
Plásmidos			
pKD46 (DH5 α) pKD4 (BW25113)	Grupo de investigación de Biología molecular de bacterias patógenas y estrategias antimicrobianas de la Universidad de Barcelona (UB).	GenR KanR, AmpR	(Doublet <i>et al.</i> , 2008) (Datsenko & Wanner, 2000)

GenR, *KanR*, *AmpR*: resistencia a Gentamicina, Kanamicina y ampicilina, respectivamente.

El crecimiento de las cepas clínicas en estudio se realizó en medio líquido Luria Bertani (LB, Condalab) o LB agar (LA; Condalab) suplementado con ampicilina (Amp) a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. El crecimiento de las cepas portadoras de los plásmidos pKD46 y pKD4 se realizó en LB o LA suplementado con gentamicina (Gen) y kanamicina (Kan) a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Todas las cepas fueron conservadas en tubos VacutainerTM con medio de conservación agar nutritivo al 0,75% (p/v), compuesto por una mezcla de agar nutritivo (11,5 g/L) (Applichem-Panreac) y caldo nutritivo (4 g/L) (Applichem-Panreac) a temperatura ambiente. También se realizó una copia para su almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ consistente de 500 μl de la cepa crecida en LB y 500 μl de glicerol 20%.

3.2. Caracterización fenotípica de la resistencia antimicrobiana (RAM)

Para el análisis fenotípico de la RAM en las cepas objeto de estudio se realizaron antibiogramas de acuerdo con el método de difusión disco-placa, descrito por Barry & Thornsberry en 1980 (Barry *et al.*, 1980), basado en la capacidad de los antibióticos para difundir desde pequeños discos impregnados con una concentración conocida sobre el agar de la placa inoculado con la cepa de estudio. A medida que el antibiótico se difunde radialmente desde el disco, inhibe el crecimiento bacteriano a su alrededor si la bacteria es sensible a dicho antibiótico. Si la cepa es resistente, no se observan halos de inhibición alrededor del disco correspondiente.

3.2.1. Preparación del inóculo

Se tomó una colonia aislada de cada cepa de *E. coli* crecida en MacConkey-lactosa (ML, Oxoid) (37 °C, 18-24 h), y se resuspendió en 5 ml de caldo de triptona-soja (TSB, Oxoid). Se ajustó la turbidez del inóculo según la escala de McFarland a un valor de 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL).

3.2.2. Inoculación de las placas

Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión obtenida y, tras rotarlo varias veces contras las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo, se realizó una siembra en césped sobre las placas Petri con agar Mueller-Hinton (MH; Oxoid), cubriendo totalmente la superficie. Se utilizaron tres placas Petri con 20 ml de medio MH por cada cepa. Se esperó entre 5-15 minutos a que el medio absorbiera el inóculo a temperatura ambiente.

3.2.3. Dispensación de los discos

Los discos de antibióticos fueron colocados sobre cada placa, separados entre si al menos 2.5 cm (6 discos/placa Petri), y presionados ligeramente con una pinza para asegurar su anclaje a la superficie del agar. Se esperó un máximo de 15 min para permitir la difusión del antibiótico a temperatura ambiente. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante 16-18 h.

3.2.4. Lectura e interpretación de los resultados

Se observó el crecimiento alrededor de cada disco, se midió el diámetro de los posibles halos de inhibición y se procedió a la interpretación de los resultados según los criterios del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). EUCAST establece dos perfiles bacterianos para cada antimicrobiano específico: Resistente (R) y Sensible (S), Por su parte, CLSI establece tres categorías: Resistente (R), Sensible (S) e Intermedio (I).

En este estudio se incluyeron antibióticos representantes de grupo de las siguientes familias:

- **Betalactámicos:** penicilinas (ampicilina), penicilinas + inhibidores de betalactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico), cefalosporinas de primera generación (cefazolina),

segunda generación (cefuroxima), tercera generación (ceftazidima y ceftriaxona) y carbapenémicos (imipenem), monobactámicos (aztreonam) y cefamicinas (cefoxitina).

- **Aminoglucósidos:** amikacina y gentamicina.
- **Tetraciclinas:** doxiciclina y tetraciclina.
- **Anfenicoles:** cloranfenicol.
- **Quinolonas:** primera generación (ácido nalidíxico) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina).
- **Diaminopirimidinas + Sulfonamidas:** trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol).

Tabla 3. Antibióticos utilizados e interpretación de los resultados según el diámetro (en mm) del halo de inhibición (CLSI, 2025; EUCAST, 2025).

Familia	Antimicrobiano	Disco	CLSI-2025			EUCAST-2025	
			R	I	S	R	S
Betalactámicos	Ampicilina	AM10	≤13	14-16	≥17	<14	≥14
	Amoxicilina-Clavulánico	AMC30	≤13	14-17	≥18	<19	≥19
	Cefazolina	CZ30	≤19	20-22	≥23	<20	≥50
	Cefuroxima	CXM30	≤14	15-22	≥23	<19	≥19
	Ceftazidima	CAZ30	≤17	18-20	≥21	-	-
	Ceftriaxona	CRO30	≤19	20-22	≥23	<24	≥27
	Imipenem	IMP10	≤19	20-22	≥23	<19	≥22
	Aztreonam	ATM30	≤17	18-20	≥21	<21	≥26
	Cefoxitina	FOX30	≤14	15-17	≥18	<19	≥19
Aminoglucósidos	Amikacina	AN30	≤16	17-19	≥20	<18	≥18
	Gentamicina	GM10	≤14	15-17	≥18	<17	≥17
Tetraciclinas	Doxiciclina	D30	≤10	11-13	≥14	-	-
	Tetraciclina	TE30	≤11	12-14	≥15	<19	≥19
Anfenicoles	Cloranfenicol	C30	≤12	13-17	≥18	<17	≥17
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	NAL30	≤13	14-18	≥19	-	-
	Ciprofloxacina	CIP5	≤21	22-25	≥26	<22	≥25
Diaminopirimidinas + Sulfonamidas	Cotrimoxazol	SXT25	≤10	11-15	≥16	<11	≥14

3.2.5. Identificación de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

La detección de cepas productoras de BLEE se realizó mediante la prueba de sinergia de doble disco (*Double Disc Synergy Test, DDST*), descrita por Jarlier *et al.* en 1988 (primer método

propuesto para identificar este tipo de fenotipo). Esta prueba se basa en la capacidad de las bacterias productoras de BLEE para hidrolizar los antibióticos betalactámicos, actividad que puede ser inhibida por ácido clavulánico, un inhibidor específico de betalactamasas. Si la cepa produce BLEE, y el ácido clavulánico inhibe la actividad de la enzima, se observa un aumento del halo de inhibición alrededor del antibiótico situado cerca del disco con clavulánico. Este efecto genera una figura característica en forma de **"cerradura" o "corcho de champagne"** entre ambos discos (Drieux *et al.*, 2008).

3.2.5.1. Dispensación de los discos

Tras haber preparado el inóculo bacteriano e inoculado las placas de MH como se describió anteriormente, los discos de antibióticos se colocaron sobre la placa: se situó un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (20 µg/10 µg) en el centro y en torno a éste, separados 30 mm (de centro a centro), discos de cefotaxima (5 µg), ceftazidima, aztreonam y cefepima (30 µg de antibiótico por disco). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

3.2.5.2. Lectura e interpretación de los resultados

El resultado se considera positivo, y por lo tanto la cepa es productora de enzimas de tipo BLEE, cuando se produce un halo de inhibición claro y amplio alrededor de los discos colocados en torno a la amoxicilina con el inhibidor ácido-clavulánico. Indicios de resistencia en torno al disco con inhibidor y/o de sensibilidad frente a la cefepima podrían sugerir que la cepa es productora de betalactamasas de tipo AmpC.

3.2.6. Ensayo de discos combinados con inhibidor de betalactamasas: determinación de producción de enzimas tipo AmpC.

Además, se complementaron los experimentos con la realización de la prueba de discos combinados con inhibidor de betalactamasas, basada en comparar, para cada cepa, el halo de inhibición alrededor de cada disco de cefotaxima y ceftazidima en solitario y con el halo de inhibición producido alrededor de cada antibiótico mencionado combinado con ácido clavulánico.

3.2.6.1. Dispensación de los discos

Tras haber preparado el inóculo bacteriano e inoculado las placas de MH como se describió anteriormente, los discos de cefotaxima (5 µg) y ceftazidima (30 µg) con y sin inhibidor (ácido clavulánico) fueron colocados sobre la placa, en torno a un disco de cefoxitina (30 µg). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

3.2.6.2. Lectura e interpretación de los resultados

Se considera el resultado positivo, y por lo tanto la cepa es productora de enzimas de tipo BLEE, cuando el diámetro del halo alrededor de cualquiera de los discos correspondientes a los dos antibióticos citados aumenta en presencia de ácido clavulánico en más de 5 mm con respecto al diámetro del halo observado en torno a cada disco en solitario. Indicios de resistencia en torno

al disco con inhibidor y/o de resistencia frente a la cefoxitina podrían sugerir que la cepa es productora de betalactamasas de tipo AmpC (Navarro *et al.*, 2011).

3.3. Análisis de genes de virulencia y resistencia en las cepas objeto de estudio.

El análisis de genes de virulencia asociados a los patotipos ExPEC, APEC y UPEC de *E. coli*, así como de genes codificantes de enzimas tipo BLEE (genes *bla*_{BLEE} codificantes de las enzimas CTX-M, SHV y TEM) se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La extracción del ADN se realizó a partir de colonias aisladas crecidas en placas de ML. Con un asa estéril de 1 μ L se tomó una colonia por cada cepa, que se suspendió en 500 μ L de agua MiliQ estéril en tubos Eppendorf. A continuación, se hirvieron las suspensiones durante 5 min a 100 °C. Tras el hervido, se centrifugaron a 11.000 rpm durante 2 minutos. El ADN bacteriano presente en el sobrenadante se usó como molde (5 μ L) en la reacción de PCR.

3.3.1. Mezcla de reacción

En la mezcla de reacción se añadió el reactivo NZYTaq 2x Green Master Mix (NZYTech), que contiene MgCl₂, dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) y la Taq polimerasa en concentraciones optimizadas, junto con el resto de los componentes (primers, agua MiliQ y ADN) (Tabla 4).

Tabla 4. Reactivos y cantidades correspondientes en la mezcla de reacción para la PCR.

NZYTaq 2x Green Master Mix	Primer F (20 μ M)	Primer R (20 μ M)	Agua MiliQ estéril	ADN
12.5 μ l	1 μ l	1 μ l	5.5 μ l	5 μ l

La cantidad de agua se ajustó hasta llegar a un volumen de mezcla de reacción de 20 μ L, alcanzando un volumen final de 25 μ L tras añadir el ADN extraído.

3.3.2. Amplificación del ADN

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneExplorer Dual Block (Bioer), donde las mezclas fueron sometidas a distintos ciclos de temperaturas y tiempos de acuerdo con el siguiente programa:

- Ciclo inicial de desnaturalización (94°C/3 min).
- 35 ciclos de
 - Desnaturalización (94°C/1 min)
 - Hibridación (t^a de hibridación/1 min)
 - Extensión (72°C/1,5 min)
- Ciclo final de extensión (72°C/3 min).

3.3.3. Lectura de los resultados

El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Cada gel de agarosa (High-Q™ Agarose, Tiaris) se preparó a una concentración del 1,5% en tampón TAE 1x (1,6M

Tris; 0,8M acetato sódico; 0,025M EDTA). Para la visualización posterior de los productos amplificados se añadieron 3 μ L de Green Safe Premium (Nzytech) por cada 100 mL de gel. En cada pocillo del gel se cargaron 7 μ L de muestra amplificada, incluyendo los controles negativos y positivos correspondientes (cepas de referencia, LREC). Los geles se corrieron en cubetas Bio-Rad, aplicando un voltaje de 140 V durante 15 min. La visualización de los resultados se realizó mediante el sistema de documentación de geles GelDoc Go (Bio-Rad).

Los patotipos a determinar incluyen el análisis de los siguientes genes de virulencia:

- Patotipo ExPEC: asociado a los genes de virulencia *PapC*, *PapEF*, *sfa/foc*, *afa/dra*, codificantes de estructuras de adhesión, *iutA* y *kpsM II* codificantes para un sideróforo y una cápsula, respectivamente (Mahmoud *et al.*, 2020);(Johnson J. R. *et al.*, 2015); (Yamamoto *et al.*, 1995); (Le Bouguéneq *et al.*, 1992);(Johnson J. R. *et al.*, 1997).
- Patotipo APEC: relacionado con los genes de virulencia *ompT*, *hlyF*, *iutA*, *iroN* e *iss*, codificantes de proteasas de péptidos antimicrobianos, vesículas productoras de toxinas, receptor de un sideróforo, receptor de membrana para la captación de hierro y proteína de supervivencia aumentada en suero, respectivamente (Johnson J. R. *et al.*, 2015);(Morales *et al.*, 2004); (Johnson J. R. *et al.*, 1997);(Johnson T. J., *et al.*, 2008);(Johnson J. R., *et al.*, 2000).
- Patotipo UPEC: vinculado a los genes de virulencia *vat*, *fyuA*, *yfcV* y *chuA*, codificantes de una toxina serina proteasa autotransportadora, el receptor de yersiniabactina, la subunidad principal de una fimbria chaperona putativa y una proteína de unión al hemo, respectivamente (Spurbeck *et al.*, 2012);(Clermont *et al.*, 2013).

3.4. Mutagénesis basada en el sistema de recombinación lambda Red

3.4.1. Extracción del ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico (pKD46 y pKD4) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del Kit comercial de Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid). Las cepas portadoras de los plásmidos pKD46 y pKD4 se cultivaron durante 24h en medio LB suplementado con Gen (resistencia codificada en pKD46) o Kan (resistencia conferida por pKD4), respectivamente. La concentración y calidad del ADN plasmídico se analizó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

3.4.1.1. Amplificación del fragmento empleado en la mutagénesis

Mediante PCR, y usando como plantilla el plásmido pKD4 purificado, se amplificó la *cassette* de resistencia a Kan presente en el plásmido mencionado. Los primers diseñados presentaban i) homología con las regiones flanqueantes de dicha *cassette* (priming sites), y ii) homología con las regiones flanqueantes del gen *mnmA* en el genoma (aproximadamente 50 pbs), que es el gen que

se quiere delecionar. De esta forma, la amplificación permitió obtener un fragmento que se empleará en la mutagénesis dirigida y facilitará la recombinación homóloga.

El diseño de los primers se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Forward: se seleccionaron 50 pb complementarias a la región inmediatamente aguas arriba del codón de inicio del gen (como máximo se pueden incluir hasta las primeras 9 pb del inicio del gen) + *priming site* 1 de pKD4.
- Reverse: se seleccionaron 50 pb complementarias a la región inmediatamente aguas abajo del codón de terminación del gen + *priming site* 2 de pKD4.

En la mezcla de reacción se añadió la polimerasa “Tiaris™ High-Fidelity DNA Polymerase”, junto con el resto de los reactivos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y cantidades correspondientes en la mezcla de reacción.

PCR Buffer (MgCl ₂ + dNTPs)	High-Fidelity DNA Polymerase	Primer F (10 μM)	Primer R (10 μM)	Agua MiliQ	ADN
5 μl	0,5 μl	2 μl	2 μl	10,5 μl	5 μl

La amplificación se llevó a cabo empleando el programa de PCR universal para el protocolo Lambda Red:

- Ciclo inicial de desnaturalización (94°C/3 min).
- 30 ciclos de
 - Desnaturalización (94°C/30 seg)
 - Hibridación (58°C/30 seg)
 - Extensión (72°C/1,5 min)
- Ciclo final de extensión (72°C/10 min).

Los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, y los amplicones obtenidos se sometieron a una digestión con la enzima de restricción Dpn I (se añadió 0,5 μl de DpnI y 10 μl de Buffer) (Restriction Enzyme DpnI, FastGene®), que elimina los residuos metilados.

3.4.1.2. Purificación del ADN digerido

La purificación del fragmento se realizó para obtener un material genético de alta calidad y libre de impurezas, adecuado para su posterior uso en técnicas de mutagénesis. Para ello se empleó el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* de Macherey-Nagel, siguiendo las indicaciones del fabricante.

La purificación se realizó en columnas con membranas de sílice, optimizadas para la eliminación de contaminantes.

Inmediatamente después de la purificación, el ADN fue sometido a un proceso de precipitación y sucesivos lavados con etanol 70% en frío, con el objetivo de eliminar posibles contaminantes residuales. Posteriormente, se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de etanol antes de la resuspensión final. El ADN concentrado se disolvió en un volumen reducido de agua ultrapura (HyPure™ Molecular Biology Grade Water, Cytiva) y su concentración fue determinada mediante espectrofotometría (NanoDrop), evaluando también su calidad a través de las proporciones de absorbancia 260/280.

3.4.2. Obtención de células bacterianas competentes

El proceso se llevó a cabo siguiendo un protocolo optimizado de obtención de células competentes en *E. coli* (Alobaidallah *et al.*, 2023). La cepa de *E. coli* en estudio se creció *overnight* en medio LB + Amp -resistencia intrínseca de la cepa-, a 37°C y agitación continua. El cultivo se usó como inóculo inicial en una proporción de 1:100 de LB + Amp en un matraz estéril. La suspensión se incubó hasta llegar a una densidad óptica 600 (OD₆₀₀) de 0,6 (0,5-0,8), correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento bacteriano.

A partir de este momento todos los pasos se realizaron en hielo. La suspensión a una OD₆₀₀ de aprox. 0,6 se mantuvo durante 15 minutos en hielo. A continuación, se procedió con 3 pasos de centrifugación y lavado, inicialmente con agua MiliQ (2 lavados) y posteriormente con glicerol 10% (un lavado). Estos lavados consiguen alterar la permeabilidad de la pared celular resultando en el estado de “competencia”, que facilitará la incorporación del ADN mediante electroporación.

Las células competentes se emplearon directamente para la electroporación del plásmido pKD46 purificado, desde donde se expresan las proteínas exonucleasa, beta y gam, cruciales para la recombinación homóloga. En el proceso, se mezclaron una alícuota de células competentes (aprox. 50 µl) y 2 µl del plásmido pKD46. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (BioRad). La electroporación se realizó en el electroporador Micropulser (BioRad) mediante el programa bacteria EC 1 (25 µF; 200 Ω; 1,8 kV). Se recuperó la mezcla en 1 mL de medio SOC precalentado a 30°C, que se incubó durante 1 h en agitación a 30°C para que el plásmido insertado se exprese.

Las suspensiones (10 y 50 µl) se cultivaron en placas de LA + Amp + Gm, que permite la selección de colonias mutantes transformadas con el plásmido pKD46 al cabo de aprox 24 h de incubación. Este plásmido posee un origen de replicación sensible a la temperatura y debe ser cultivado a 29°C.

3.4.3. Deleción génica mediante Lambd red

Como se mencionó anteriormente, el protocolo de mutagénesis descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) se basa en la deleción génica mediante recombinación

homologa, facilitada por el sistema de Lambda Red, un sistema recombinante derivado del bacteriófago lambda.

El protocolo fue el siguiente: a partir de un cultivo ON (en agitación, 29°C) en LB suplementando con Amp y Gen de cada cepa de *E. coli* + pKD46, se subcultivaron 500 µL en 50 mL de medio LB + Amp + Gen. Esta suspensión se mantuvo en agitación constante a 29°C, y se realizaron mediciones periódicas de la OD₆₀₀. Cuando la OD₆₀₀ alcanzó un valor de 0,3-0,4, se añadieron 3 ml de L-arabinosa 60 mM, imprescindible para que se produzca la expresión de las enzimas implicadas en recombinación desde el plásmido pKD46. El cultivo se mantuvo en agitación a 29°C durante 1-2h adicionales hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ entre 0,6-0,8.

Una vez alcanzada la OD₆₀₀ deseada, el cultivo bacteriano se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL y se mantuvo en hielo durante al menos 10 minutos. Posteriormente, se realizaron varios pasos de centrifugación y lavado. Los dos primeros lavados se realizaron con H₂O MiliQ estéril, y los otros dos se realizaron con glicerol al 10%. Las muestras y los medios usados en los lavados se mantuvieron en hielo entre centrifugado y centrifugado.

Finalmente, el pellet celular se resuspendió en 200 µL de glicerol al 10 %. Esta suspensión fue distribuida en alícuotas de 90 µL en tubos de 1,5 mL y mantenida en hielo hasta el momento de la electroporación.

Se añadieron 3 µL (entre 500 ng y 1000 ng) del fragmento de ADN amplificado a partir de pKD4 y purificado a un alícuota de células electrocompetentes. Como control negativo, se usó una alícuota de células competentes donde se añadieron 3 µL de agua MiliQ en lugar de ADN. La electroporación se llevó a cabo como se mencionó anteriormente.

Tras la electroporación, las células electroporadas se recuperaron en un 1 ml de medio SOC precalentado y las suspensiones se incubaron durante 1,5 horas a 37 °C con agitación. A continuación, las suspensiones se centrifugaron a 5000 rpm durante 3 minutos. El pellet celular se resuspendió y se sembró todo el volumen en una placa de LA suplementada con Kan. Se emplearon perlas de cristal (glass beads) para asegurar la distribución homogénea de cada suspensión en la placa correspondiente. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche con el fin de obtener colonias mutantes potenciales.

Las colonias mutantes potenciales obtenidas se re-cultivaron en placas de LA suplementado con Amp y Kan para confirmar su resistencia. Las placas se incubaron a 37-40 °C overnight. Mediante PCR usando controles (positivo y negativo), así como primers específicos de verificación de la región delecionada (el gen *mmA*), se confirmó que estos cultivos/colonias eran mutantes carentes del gen mencionado.

Para determinar la temperatura óptima de hibridación de cada set de primers de verificación, se realizó una reacción de PCR con gradiente de temperaturas. Para ello, se aplicaron temperaturas comprendidas entre los 55°C-72°C. Tras la amplificación, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se determinó la temperatura óptima de anillamiento comparando la intensidad y especificidad de las bandas en cada condición.

En ambos casos, en la mezcla de reacción se utilizó el reactivo STOUT™ Green PCR Master Mix (2x), junto con el resto de los componentes que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos y cantidades correspondientes empleados en la mezcla de reacción.

STOUT™ Green PCR Master Mix (2x)	Primer F (10 μM)	Primer R (10 μM)	Agua MiliQ	ADN
12,5 μl	1 μl	1 μl	3,5 μl	5 μl

El ADN usado como plantilla en la reacción de PCR, se extrajo de cada una de las colonias a verificar como se describió anteriormente. Las muestras fueron sometidas a distintos ciclos de temperaturas y tiempos de según el siguiente programa de PCR:

- Ciclo inicial de desnaturalización (94°C/3 min).
- 35 ciclos de
 - Desnaturalización (94°C/1 min)
 - Hibridación (tª de hibridación (65°C)/1 min)
 - Extensión (72°C/1,5 min)
- Ciclo final de extensión (72°C/3 min).

3.4.3.1. Lectura de resultados

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizaron como se describió en secciones anteriores.

3.5. Estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en las cepas objeto de estudio

Además de los antibiogramas, otro método ampliamente utilizado para determinar la resistencia de un microorganismo a un determinado antibiótico es el análisis de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas inglés). La MIC se define como la concentración más baja de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo tras un periodo de incubación definido (normalmente 18 horas a 37°C para bacterias clínicas) (Andrews, 2001).

El valor de la MIC no es constante para un mismo compuesto, ya que puede estar influido por diversos factores experimentales, como el microorganismo de estudio, la concentración inicial de inóculo o el tiempo de incubación. Por este motivo, en el ámbito clínico se emplean metodologías

estandarizadas que establecen de forma precisa las condiciones en las que se debe realizar el ensayo para garantizar reproducibilidad en los resultados.

3.5.1. Preparación de un stock de cefotaxima

A partir de un vial comercial de cefotaxima sódica (Sigma-Aldrich), se preparó una solución stock a una concentración de 50 mg/ml, disolviendo 50 mg del antibiótico en 1 ml de agua MiliQ estéril. Esta solución fue almacenada a 2-4°C, según las recomendaciones del fabricante, hasta su utilización. A partir de esta solución stock, preparamos una solución de trabajo a 1024 µg/ml en 1 ml de medio MH ($Ab_{m\acute{a}x}$), a partir de la cual se realizaron las diluciones seriadas (1:2) para la determinación de la MIC.

3.5.2. Preparación del inóculo

Las cepas silvestres y mutantes se crecieron en 2 ml de medio MH durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Al día siguiente, cada cultivo se diluyó 1:10 (100 µl de cultivo y 900 µl de LB estéril). A continuación, se midió la OD_{600} y se realizó una nueva dilución para ajustar la OD_{600} a 0,1, y estas soluciones fueron nuevamente diluidas a una OD_{600} final de 0,00065 (equivalente a aprox. 10^6 UFCs/ml), que fue el inóculo inicial empleado para la determinación de la MIC.

3.5.3. Determinación de la MIC

El procedimiento se llevó a cabo en una placa microtiter de 96 pocillos. Las primeras 10 columnas se destinaron al estudio de la MIC de CTX en cada cepa bacteriana, y las columnas 11 y 12 se destinaron a los controles positivo y negativo, respectivamente. La configuración de la placa se realizó como se indica: se añadieron 50 µl de medio MH a cada pocillo de las columnas 2 a las 11 con una pipeta multicanal, y 100 µl a la columna 12. Las diluciones seriadas de antibiótico se realizaron añadiendo 100 µl de la solución $Ab_{m\acute{a}x}$ a los pocillos de la columna 1, y transfiriendo 50 µl desde esta columna a la columna 2. Se repitió el paso transfiriendo de nuevo 50 µl de la columna 2 a la columna 3. Este paso se repitió hasta llegar a la columna 10, de la cual se desecharon 50 µl. De esta forma, se consigue reducir a la mitad la concentración de antibiótico en cada paso de dilución, pasando de una concentración de CTX de 512 mg/L, en el primer pocillo, a una concentración de 1 mg/L en el último (rango ensayado 512-1 mg/L).

Finalmente se añadieron 50 µl del inóculo inicial de OD_{600} 0,00065 de cada cepa a los pocillos de las columnas de la 1 a la 11. La columna 12 no se inoculó con bacteria y se usó como control negativo. La placa se incubó a 37°C durante 20-24 horas.

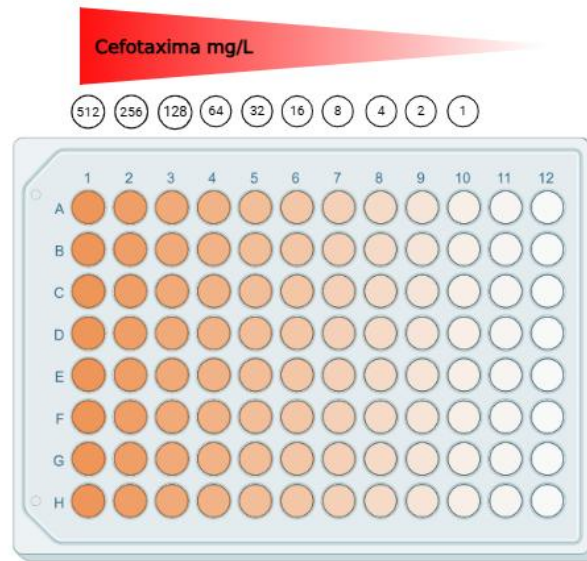


Figura 3. Configuración de la placa microtiter de 96 pocillos para la determinación de la MIC de CTX. Se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la concentración máxima ($Ab_{m\acute{a}x}$) de CTX. Las filas A y B se corresponden con las cepas silvestres, las filas C-E se corresponden con la cepa D66 mutada carente de *mnmA*, y las filas F-H se corresponden con la cepa SB18101 mutada carente de *mnmA* (Creado con BioRender.com).

3.5.4. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs)

Para verificar la cantidad de colonias en cada inóculo inicial, se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFCs).

Para ello, para cada una de las cepas de estudio se preparó una serie de diluciones seriadas 1:10 en solución salina PBS 1x (Corning). Se partió de 100 μ l del inóculo inicial (OD_{600} de 0,00065, aproximadamente 10^6 UFCs/mL) que fueron añadidos al primer Eppendorf con 900 μ l de PBS, obteniendo una concentración de 10^{-1} . De este Eppendorf, se transfirieron 100 μ l al siguiente Eppendorf con 900 μ l de PBS, obteniendo una concentración de 10^{-2} . Este proceso se repitió hasta alcanzar una concentración de 10^{-8} .

Se seleccionaron cuatro diluciones (10^{-3} - 10^{-6}) y se sembraron tres gotas de 10 μ l de cada una sobre la superficie de una placa de LA que se incubó a 37 C durante la noche. El recuento de UFCs/mL se realizó al día siguiente.

3.6. Ensayo de cinética de muerte bacteriana: “Time-Kill assay”

El ensayo “Time-Kill assay” se realizó para evaluar la efectividad de la CTX (a una concentración de aprox. $\frac{1}{2}$ de la MIC detectada en la cepa silvestre) a lo largo del tiempo sobre las cepas silvestres y sus mutantes correspondientes, y comparar el crecimiento de ambas en presencia del antibiótico. Inicialmente, las cepas silvestres y mutantes se cultivaron en medio MH

durante 18-20 horas a 37°C. Al día siguiente, se prepararon diluciones en 5 ml de MH suplementado con 256 mg/L de cefotaxima de cada cultivo a una OD₆₀₀ final de 0,00065, designándose como tiempo 0 h del ensayo. Las suspensiones se incubaron a 37°C y agitación constante de 200 rpm durante 24 h.

Se determinaron las UFC para cada cultivo en los tiempos 0, 3, 6 y 24 h, después de la exposición al antibiótico, mediante la preparación de diluciones seriadas 1:10 en 900 µl de solución salina PBS. Se seleccionaron diluciones apropiadas y se sembraron dos gotas de 20 µl de cada cepa en placas de MH. En cada tiempo se ensayaron las siguientes diluciones: cepas silvestres: 10⁻³-10⁻⁵ (t=0 h), 10⁰-10⁻⁵ (3 h), 10⁰-10⁻⁶ (t=6 h) y 10⁻⁵-10⁻⁸ (t=24 h); cepas mutantes: 10⁻³-10⁻⁵ (t=0h), 10⁰-10⁻⁵ (t = 3 h), 10⁰- 10⁻⁴ (t=6 h) y 10⁰-10⁻⁴ (t=24 h). Las placas se incubaron 24 h a 37°C y se procedió al recuento de las UFCs/mL.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fenotípica de las cepas objeto de estudio

4.1.1. Crecimiento y morfología de las cepas

La identificación fenotípica de las cepas bacterianas en estudio como “coliformes” se llevó a cabo utilizando medio ML, un medio selectivo para bacterias Gram negativas, como *E. coli*, especie que se caracteriza por su capacidad para degradar lactosa. La selección se basa precisamente en esta capacidad metabólica. El medio ML contiene lactosa como única fuente de carbono fermentable. Si las bacterias presentes son capaces de fermentar lactosa -como es el caso de *E. Coli*- se produce una acidificación del medio debido a la generación de ácidos orgánicos, lo que provoca una disminución del pH. Esta acidificación se manifiesta visualmente por la formación de colonias de color rosado o rojo. Por el contrario, si las bacterias no fermentan lactosa y metabolizan en su lugar las peptonas presentes en el medio, se produce amoníaco como subproducto, lo que alcaliniza el medio e incrementa el pH. Como resultado, las colonias formadas son de color blanco o incoloras (Allen, 2005).

En este estudio, el crecimiento de las colonias de ambas cepas en el medio de cultivo ML resultó en la formación de colonias de coloración rosada, confirmando su fenotipo lactosa positivo. Además, la cepa clínica humana (D66) mostró un fenotipo liso, mucoide y filamentososo; por su parte, la cepa de origen aviar (SB18101) mostró un fenotipo liso.



Figura 4. Crecimiento de las cepas objeto de estudio en medio ML. (A) Cepa D66 aislada de sangre humana. (B) Cepa SB18101 de origen aviar.

4.1.2. Perfil de resistencia a antimicrobianos

El análisis de resistencia bacteriana mediante antibiogramas reveló patrones de sensibilidad y resistencia diferenciales entre las dos cepas estudiadas frente a diversos antibióticos (Tabla 7). De los 17 antibióticos evaluados en el estudio, la cepa clínica humana D66 mostró resistencia frente a 8 de ellos, (aztreonam, amoxicilina-clavulánico, ampicilina, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, doxiciclina y tetraciclina), mientras que la cepa aislada de pollo SB18101 mostró resistencia frente a 6 (ampicilina, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, doxiciclina y tetraciclina).

La cepa de referencia, *E.coli* MG1655 (K12) usada como control, fue sensible a todos los antibióticos ensayados como era de esperar.

Tabla 7. Perfiles de resistencia detectados en las cepas de *E.coli* MG1655 (control), D66 y SB18101 mediante antibiogramas.

Antimicrobiano	Disco	MG1655	B18101	D66
Ampicilina	(AM10)	S	R	R
Amoxicilina-Clavulánico	(AMC30)	S	S	R
Cefazolina	(CZ30)	S	R	R
Cefuroxima	(CXM30)	S	R	R
Ceftazidima	(CAZ30)	S	S	R
Ceftriaxona	(CRO30)	S	R	R
Imipenem	(IMP10)	S	S	S
Aztreonam	(ATM30)	S	S	R
Cefoxitina	(FOX30)	S	S	S
Amikacina	(AN30)	S	S	S
Gentamicina	(GM10)	S	S	S
Doxiciclina	(D30)	S	R	R
Tetraciclina	(TE30)	S	R	R
Cloranfenicol	(C30)	S	S	S
Ac. Nalidixico	(NAL30)	S	S	S
Ciprofloxacina	(CIP5)	S	S	S
Cotrimoxazol	(SXT25)	S	S	S

S: sensible ; *R*: resistente.

Adicionalmente, se evaluaron posibles sinergias entre antibióticos y un adyuvante potencial mediante la prueba DDST. En ambas cepas estudiadas se observó la formación de un halo de sinergia en forma de “corcho de botella” entre los antibióticos cefotaxima, ceftazidima, cefepima, aztreonam y el adyuvante amoxicilina-ácido clavulánico (Figura 5). La formación de dicho halo indica un efecto sinérgico, atribuible a la inhibición de las betalactamasas por parte del ácido clavulánico, lo que restaura la actividad de los antibióticos betalactámicos frente a cepas previamente resistentes. El aumento del halo de inhibición en dirección al disco de amoxicilina-ácido clavulánico, adoptando la forma mencionada característica de cerradura o “corcho de botella”, se interpreta como un resultado positivo en la prueba DDST y, por tanto, indica que la cepa es productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Drieux *et al.*, 2008).

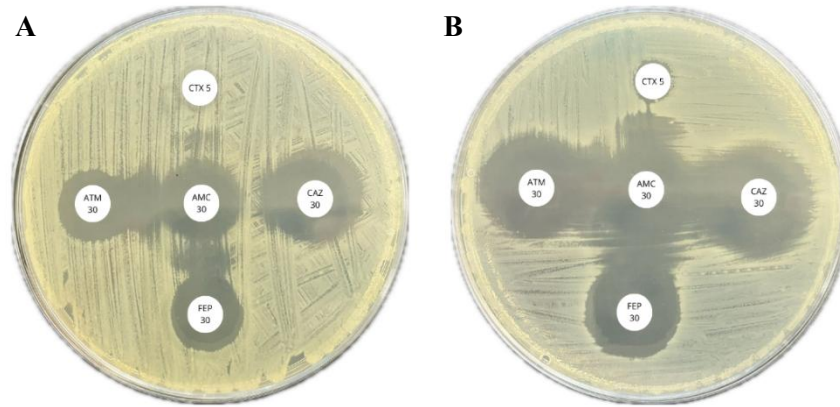


Figura 5. Prueba DDST para las cepas de *E.coli* D66 (A) y SB18101 (B).

Los resultados obtenidos en la prueba de discos combinados con inhibidor (CLA) respaldan los resultados anteriores. En ambas cepas se observó un incremento de al menos 5 mm en el halo de inhibición en presencia del inhibidor (CTX CLA y CAZ CLA) en comparación con el halo de inhibición sin inhibidor (CTX 5 y CAZ 30). Además, las cepas analizadas no presentaron resistencia frente al disco de cefoxitima (FOX), lo que sugiere que no son productoras de betalactamasas tipo AmpC.

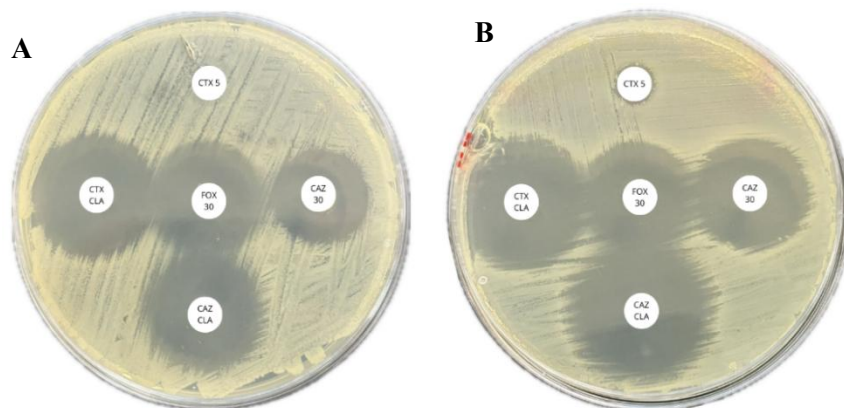


Figura 6. Prueba de discos combinados con inhibidor en las cepas de *E.coli* D66(A) y SB18101 (B).

4.2. Caracterización genotípica de las cepas objeto de estudio

4.2.1. Perfil de virulencia y función de los genes analizados

El análisis molecular mediante PCR de los genes asociados a patotipos ExPEC, APEC y UPEC, confirmó el fenotipo APEC en ambas cepas estudiadas. En ambos casos se obtuvo un resultado positivo para los genes *ompT*, *hlyF*, *iutA*, *iroN* e *iss*. La presencia de al menos cuatro de estos cinco marcadores genéticos es un criterio ampliamente aceptado para la identificación presuntiva del fenotipo APEC, lo que respalda su clasificación como cepas potencialmente patógenas de origen aviar (Johnson T. J., *et al.*, 2008). Asimismo, en la cepa clínica humana se detectó la presencia del gen *vat*, asociado con el patotipo UPEC, y del gen *iutA*, relacionado con el patotipo ExPEC. Por su parte, la cepa de origen aviar presentó resultados positivos para los

genes *chuA* y *vat*, ambos vinculados al fenotipo UPEC, así como para el gen *iutA*, también asociado al patotipo ExPEC (Johnson, T. J., *et al.*, 2008).

El gen *iutA*, que codifica una proteína transportadora de sideróforos, forma parte del operón de aerobactina, compuesto por cinco genes que conforman un sistema especializado para la adquisición de hierro, un factor crucial para la supervivencia y proliferación bacteriana dentro del hospedador. La proteína codificada por *iutA* se localiza en la membrana externa y tiene la función de reconocer y unir con alta afinidad el complejo aerobactina-Fe³⁺, facilitando su transporte al interior de la célula bacteriana. Este sistema otorga una ventaja competitiva en ambientes con baja disponibilidad de hierro, como los tejidos del hospedador durante la infección (Chouikha *et al.*, 2008).

Asimismo, los genes *vat* y *chuA* codifican una toxina serina proteasa autotransportadora que contribuye a la citotoxicidad y a la evasión de la respuesta inmune del hospedador y una proteína de membrana externa implicada en la captación de hemo como fuente de hierro, favoreciendo así la supervivencia bacteriana en ambientes con disponibilidad limitada de este elemento, como el tracto urinario, respectivamente (Spurbeck *et al.*, 2012);(Clermont *et al.*, 2013).

Por otra parte, el gen *ompT* codifica una proteasa de membrana externa que degrada péptidos antimicrobianos, contribuyendo a la resistencia frente a mecanismos de defensa del hospedador (Johnson J. R. *et al.*, 2015). El gen *iss* (increased serum survival) codifica una proteína que aumenta la resistencia bacteriana a la acción del complemento en suero, favoreciendo la supervivencia sistémica (Johnson T. J., *et al.*, 2008). Por su parte, el gen *iroN* codifica un receptor de membrana encargado de la captación de sideróforos catecolatos, facilitando la adquisición de hierro, mientras que *hlyF* está involucrado en la producción de vesículas de membrana externa que contienen toxinas, potenciando la citotoxicidad y la diseminación de la infección (Morales *et al.*, 2004); (Johnson J. R., *et al.*, 2000).

4.2.2. Perfil de resistencia: detección de genes *bla_{BLEE}*

El análisis molecular por PCR dirigido a la detección de genes *bla* asociados enzimas de tipo BLEE, específicamente CTX-M, SHV y TEM, se llevó a cabo en ambas cepas bacterianas. Se identificó el gen *bla_{CTX-M-1}* en ambas cepas. Adicionalmente, se detectó el gen *bla_{TEM}* únicamente en la cepa clínica humana, mientras que ninguna de las dos cepas resultó positiva para el gen *bla_{SHV}*.

La detección del gen *bla_{CTX-M-1}* en ambas cepas confirma su capacidad para producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE), lo cual se correlaciona con la resistencia observada a cefalosporinas de espectro extendido, incluyendo CTX, en los antibiogramas (Tabla 7). La presencia adicional del gen *bla_{TEM}* en la cepa clínica humana sugiere la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia betalactámica en esta cepa, lo que se correspondería con el perfil de

resistencia aún más amplio detectado en los antibiogramas, dificultando el tratamiento antimicrobiano.

4.3. Obtención de mutantes carentes del gen *mnmA* en las cepas objeto de estudio

Mediante el método de mutagénesis descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000), se obtuvieron colonias bacterianas resistentes a ampicilina (Amp) y kanamicina (Kan). La verificación de dichas colonias como mutantes se realizó mediante PCR, confirmando la delección exitosa del gen *mnmA* en algunas de las mismas (Figura 4A). La aparición de bandas inespecíficas (Figura 4A) conllevó la realización de una PCR en gradiente de temperaturas comprendido entre 55-72°C para determinar la temperatura óptima de anillamiento de los primers de verificación, que fue de 65 °C (Figura 4 B). Se repitió la PCR empleando dicha temperatura y se corroboró la inserción de la casete de resistencia a Kan en sustitución de la región correspondiente al gen delecionado -se obtuvo una banda del tamaño esperado (1956 pb) en ausencia del gen-, en colonias seleccionadas (Figura 4 C). Como controles, se incluyeron una cepa silvestre y una muestra de agua. Los controles mostraron los resultados previstos: amplificación en la cepa silvestre dando como resultado una banda de 1587 pb y ausencia de producto en la muestra de agua (Figura 4C).

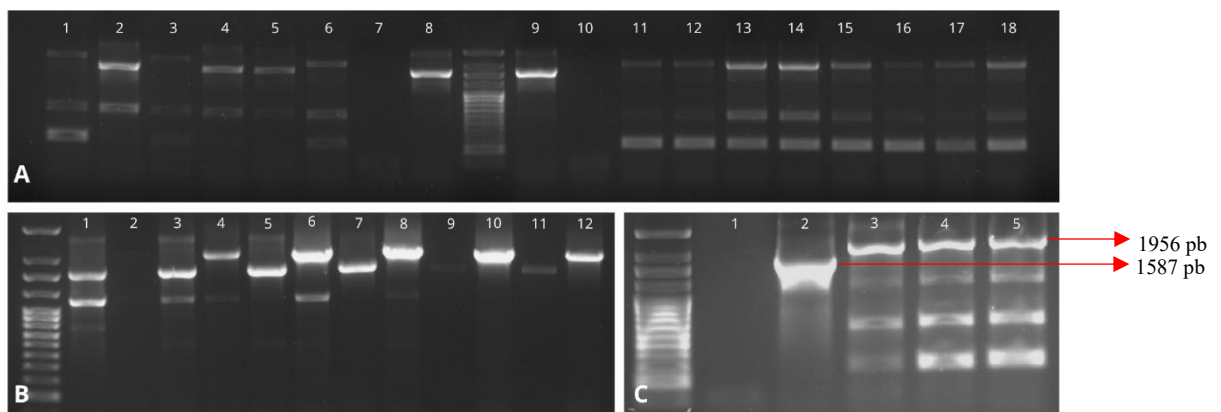


Figura 7. PCR de verificación en las colonias transformadas obtenidas a partir de la cepa de pollo (1-8) y de la cepa humana (10-19) (A). PCR en gradiente de temperaturas: de izquierda a derecha se estudiaron las siguientes temperaturas 55°C, 60°C, 62°C, 65°C, 69°C y 72°C (B). PCR de verificación para las colonias seleccionadas y empleadas en este trabajo: cepa humana (3 y 4), cepa de pollo, (5). Controles: agua (1) y cepa silvestre (2)(C).

4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CTX en las cepas silvestres y mutantes

El análisis de la MIC de CTX reveló diferencias en la susceptibilidad al antibiótico entre las cepas silvestres y sus respectivas mutantes con delección del gen *mnmA*: i) Las cepas silvestres, tanto la cepa clínica humana como la aislada de pollo presentaron valores de MIC de >512 mg/L y 512 mg/L, respectivamente. ii) La eliminación del gen *mnmA* provocó una disminución notable en la MIC de CTX, reduciéndose a 128 mg/L en ambas cepas mutantes. Esta reducción representa una disminución de 4 a 8 veces en la MIC, dependiendo del origen de la cepa (Tabla 8).

Tabla 8. Valores obtenidos en el análisis de la MIC.

Cepa	MIC (mg/L)
Silvestre humana	>512
Silvestre aviar	512
Mutante humana	128
Mutante aviar	128

Los valores de MIC obtenidos indican que la inactivación del gen *mnmA* tiene un impacto significativo en la susceptibilidad de las cepas bacterianas analizadas frente a CTX, lo cual concuerda con lo reportado en estudios previos (Alobaidallah *et al.*, 2023). No obstante, al comparar estos resultados con los obtenidos para la cepa de referencia previamente analizada — en la que se observó una reducción de la MIC de 256 a 16 mg/L (una disminución de 16 veces)(Alobaidallah *et al.*, 2023)— se evidencia que la disminución en las cepas clínicas estudiadas es menos pronunciada. Esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza de las cepas utilizadas. Mientras que la cepa de referencia corresponde a una *E. coli* de laboratorio modificada genéticamente mediante la inserción de un plásmido portador del gen *bla_{CTX-M-1}*, las cepas clínicas presentan una resistencia natural. Esta diferencia en el origen y mecanismo de resistencia podría explicar la menor reducción observada en la MIC tras la inactivación de *mnmA* en las cepas clínicas.

Este hallazgo, junto con los resultados previamente reportados (Alobaidallah *et al.*, 2023), refuerza la hipótesis de que *mnmA* forma parte del resistoma secundario de *E. coli*. La delección de este gen conlleva un aumento en la susceptibilidad bacteriana a CTX, lo que sugiere que *mnmA* desempeña un papel indirecto pero relevante en los mecanismos de resistencia antimicrobiana. Sin embargo, la reducción observada en los valores de MIC no fue suficiente para re-sensibilizar las cepas a CTX, de acuerdo con los criterios establecidos por los estándares internacionales CLSI y EUCAST (CLSI, 2025; EUCAST, 2025), los cuales definen como susceptible una cepa con una MIC ≤ 1 mg/L.

4.5. Análisis de la cinética de muerte bacteriana mediante “Time-Kill Assay”

El estudio de la cinética de muerte bacteriana mostró resultados variables entre las cepas silvestres y sus respectivas cepas mutantes con delección del gen *mnmA*, cuando se cultivaron en presencia de 256 mg/L de CTX (concentración aproximada de 1/2 de la MIC determinada para la cepa silvestre), como era esperado, en concordancia con los resultados obtenidos de la MIC. Así pues, en las dos cepas mutantes $\Delta mnmA$, derivadas de la cepa clínica humana y de la aislada de pollo, se observó una reducción gradual de las UFCs/mL a lo largo del tiempo de estudio (24 h). Por el contrario, ambas cepas silvestres, experimentaron una disminución inicial en el crecimiento

a las 3 h, seguida de un aumento exponencial hasta las 24 horas después de la exposición a CTX (Figura 8).

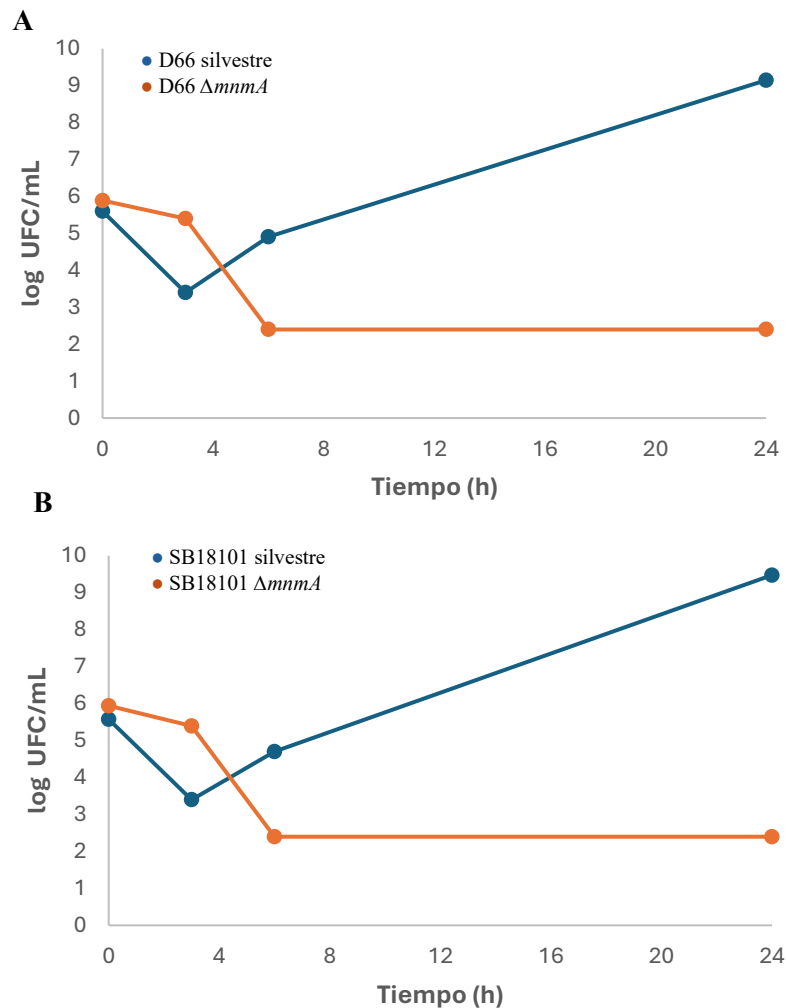


Figura 8. Curvas de crecimiento bacteriano obtenidas en el ensayo “Time-Kill Assay”. A. Cepas clínicas humanas (D66) y su respectiva mutante (D66 $\Delta mnmA$). B. Cepas de origen aviar (SB18101) y su respectiva mutante (SB18101 $\Delta mnmA$).

Estos hallazgos sugieren que el gen *mnmA* de *E.coli* desempeña un papel relevante en la resistencia frente a CTX en las cepas objeto de estudio CTXM-1 positivas, ya que su delección aumenta la susceptibilidad bacteriana al antibiótico. Esto se confirma por las diferencias observadas en la cinética de crecimiento bacteriano entre las cepas silvestres y sus respectivas cepas mutantes, con una diferencia aprox. de 7 unidades logarítmicas. En consecuencia, se evidencia un mayor efecto de CTX como agente modulador del crecimiento bacteriano dentro del RS de *E. coli*.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- I. El análisis de caracterización molecular reveló que las cepas en estudio portan múltiples marcadores genéticos asociados al patotipo APEC (*ompT*, *hlyF*, *iutA*, *iroN* e *iss*) de *E. coli*. Además, ambas cepas fueron positivas para el gen de resistencia *bla*_{CTXM-1}, confirmando su genotipo asociado a resistencia a cefalosporinas de amplio espectro. Estos hallazgos se correlacionan con los perfiles de resistencia fenotípica observados en los antibiogramas, respaldando la concordancia entre los determinantes genéticos y el comportamiento antimicrobiano de las cepas.
- II. La delección del gen *mnmA* y su reemplazo exitoso por el casete de resistencia a kanamicina, codificado en el plásmido pKD4 mediante el sistema de mutagénesis λ -Red, se confirmó mediante PCR de verificación en ambas cepas. Este procedimiento permitió la obtención de las cepas mutantes $\Delta mnmA$, que posteriormente fueron empleadas en los ensayos funcionales para evaluar el impacto de dicho gen en la resistencia a cefalosporinas.
- III. La reducción observada en los valores de la MIC de CTX en las cepas $\Delta mnmA$ indica un aumento en la susceptibilidad bacteriana al antibiótico, lo que pone de manifiesto el papel funcional del gen *mnmA* dentro del resistoma secundario de *E. coli*. Estos resultados sugieren que *mnmA* contribuye, de manera indirecta, a los mecanismos de resistencia a cefalosporinas, y que su inactivación puede modular la respuesta antimicrobiana de las cepas portadoras. Aunque la delección de *mnmA* incrementa la susceptibilidad a CTX, este efecto no alcanza el umbral clínico requerido para considerar a las cepas como sensibles al antibiótico.
- IV. El ensayo de cinética de muerte bacteriana (Time-Kill Assay) evidenció una reducción significativa en las UFC/mL en las cepas $\Delta mnmA$ en comparación con sus respectivas cepas silvestres, tras la exposición a 256 mg/L de cefotaxima (CTX), correspondiente a aproximadamente la mitad de la MIC determinada para la cepa salvaje. Estos resultados indican que la delección del gen *mnmA* incrementa la eficacia bactericida de CTX, reforzando su papel como modulador de la resistencia dentro del resistoma secundario de *E. coli*.
- V. La comparación de nuestros resultados con los previamente obtenidos para la cepa de laboratorio de *E. coli*, mostró una tendencia similar en cuanto al aumento de susceptibilidad tras la delección de *mnmA*, aunque con una magnitud de cambio menor en las cepas clínicas. Esta diferencia podría atribuirse a características intrínsecas de las cepas analizadas, particularmente al tipo de resistencia que presentan: natural en las cepas clínicas frente a resistencia adquirida mediante modificación genética en la cepa de

laboratorio. Estos hallazgos subrayan la influencia del contexto genético y del origen de la resistencia en la respuesta bacteriana a la inactivación de genes del resistoma secundario.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir de los hallazgos obtenidos en este estudio, se plantean varias líneas de investigación futuras con el objetivo de profundizar en el papel del gen *mnmA* y otros componentes del resistoma secundario de *E. coli*:

- Evaluación de tratamientos combinados: Será fundamental estudiar el efecto de la delección de *mnmA* en el contexto de tratamientos combinados, particularmente con CTX y GEN, para determinar posibles sinergias terapéuticas.
- Generación de nuevos mutantes: Se propone la obtención de mutantes individuales para otros genes identificados como relevantes en el resistoma secundario (*cpxR*, *dnaK*, *rsgA*), así como la construcción de dobles mutantes. Esta estrategia permitiría explorar interacciones genéticas y su impacto acumulativo en la susceptibilidad a CTX, con el objetivo de alcanzar niveles de sensibilidad aceptados por los estándares de EUCAST y CLSI.
- Validación experimental: Es necesario completar los dos replicados biológicos restantes del ensayo de Time-Kill Assay para validar los resultados preliminares y asegurar la reproducibilidad de los datos.
- Ensayos funcionales: Se plantea la realización de ensayos funcionales con las cepas mutantes obtenidas, con el objetivo de determinar el papel de los genes del resistoma secundario en la supervivencia y/o virulencia bacteriana. Estos estudios permitirán evaluar cómo las delecciones génicas afectan el comportamiento fisiológico y patogénico de las cepas, aportando información clave sobre su contribución a la resistencia antimicrobiana y al potencial adaptativo de *E. coli* en distintos contextos.

7. ANEXOS

7.1. Compilación de primers

Primers y condiciones de trabajo escogidas para la detección de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M de los grupos 1 y 9.						
Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (mL)	Producto PCR (pb)	T° (°C) Anillamiento	Referencia
<i>bla</i> CTX-M-grupo 9	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	0,3	856	64	(Soler Bistué <i>et al.</i> , 2000)
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC				
<i>bla</i> CTX-M-grupo 1	M13U	GGTAAAAAATCACTGCGTC	0,5	863	60	(Saladín <i>et al.</i> , 2002)
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC				
<i>bla</i> TEM	TEM-1F	ATGAGTATTCAACATTCCG	0,5	868	58	(Rasheed <i>et al.</i> , 1997)
	TEM-1R	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
<i>bla</i> SHV	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTACTCGCC	0,3	879	64	(Mora <i>et al.</i> , 2013)
	SHV-R2	CCCGGCGATTGCTGATTCGC				

Primers empleados para la detección de genes codificantes de factores de virulencia de <i>E. coli</i>						
Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	T° (°C) Anillamiento	Referencia
PapC	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0.5	205	60	(Johnson J. R. <i>et al.</i> , 2015)
	Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA				
PapEF	PapEF F	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	0.5	336	62	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1995)
	PapEF R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA				
<i>Sfa/foc</i> DE	<i>sfa</i> 1	CTCCGGGAACTGGGTGCATCTTAC	0.5	410	64	(Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Sfa</i> 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA				
<i>Afa/dra</i> BC	<i>afa</i> 1	GCTGGGCAGCAAAGTATAAAGTCTC	0.5	750		
	<i>afa</i> 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG				
<i>yfcV</i>	<i>yfcV</i> -F	ACATGGAGACCACGTTCCACC	0.5	292	66	(Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
	<i>yfcV</i> -R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG				
<i>iutA</i>	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	0.5	301	64	(Johnson J. R. <i>et al.</i> , 1997)
	Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG				
<i>iroN</i>	<i>Ironec</i> -f	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	0.3	665	66	(Johnson <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Ironec</i> -r	GACGCCGACATTAAGACGCAG				
<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i> -F	GTAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	0.5	850	66	(Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
	<i>fyuA</i> -R	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
<i>iss</i>	<i>is</i> -f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	0.3	323	66	(Johnson T. J. , <i>et al.</i> , 2008)
	<i>is</i> -r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA				

Continuación						
Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	T ^o (-C) Anillamiento	Referencia
OmpT	Forward	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	1	559	60	(Johnson J. R. <i>et al.</i> , 2015)
	Reverse	CCCgggTCATAGTgTTCATC				
kpsM II	KpsII f	GCGCATTGCTGATACTGTTG	0.5	272	64	(Johnson J. R. & Stell, 2000)
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA				
hlyF	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAA	0.5	444	60	(Morales <i>et al.</i> , 2004)
	Reverse	TTTGGCGGTTTAGGCATTC				
vat	vat-F	TCAGGACACGTTTCAGGCATTCAGT	0.5	1100	66	(Spurbeck <i>et al.</i> , 2012)
	Vat-R	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
chuA	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	0,5	288	58	(Clermont <i>et al.</i> , 2013)
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				

Primers usados para la mutagénesis			
Primer	Secuencia (5'->3')	Producto PCR (pb)	Referencia
<i>mmmA</i> _F	TGATAGAATACGCCGCTTGAAGTTCAATGTCGTGAGTGATCCAATGTCTTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	1251	Este estudio
<i>mmmA</i> _R	GTCATAGTAATCTTTGCCACGTTCACTGCTTCCTTGTTTTAAGTAAAGACATA TGAATATCCTCCTTAGTTCCT		Este estudio
Primers usados para la verificación de mutantes			
Primer	Secuencia (5'->3')	Producto PCR (pb)	Referencia
<i>mmmA</i> _F	CCCGACCCAGCCTCATGACA	1956	(Alobaidallah <i>et al.</i> , 2023)
<i>mmmA</i> _R	GGGTTTCCAGCCCGACGCGC		
Primers usados para la amplificación de cassettes de resistencia			
Primer	Secuencia (5'->3')	Producto PCR (pb)	Referencia
kanF	CAGACAATCGGCTGCTCTGA	340	Este estudio
kanR	GATGTTTCGCTTGGTGGTCG		Este estudio

8. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. E. (2005). MacConkey agar plates protocols. *American Society for Microbiology*, 30. <https://asm.org/protocols/macconkey-agar-plates-protocols>
- Alobaidallah, M. S. A., García, V., De Mets, R., Wellner, S. M., Thomsen, L. E., Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2023). Uncovering the Important Genetic Factors for Growth during Cefotaxime-Gentamicin Combination Treatment in blaCTX-M-1 Encoding *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060993>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Astocondor-Salazar, L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación En Salud*, 2(2), 42–49. <https://doi.org/10.35839/repis.2.2.224>
- Barry, A. L., Thornsberry, C., Jones, R. N., & Gerlach, E. H. (1980). Interpretive Standards for Disk Susceptibility Tests with Sch 21420 and Amikacin. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 18, Issue 4).
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria and Their Role in Antibiotic Resistance. *Future Microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 62, Issue 10). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Che, M., Birk, T., & Hansen, L. T. (2023). Prevalence and Transmission of Extended-Spectrum Cephalosporin (ESC) Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Poultry Production Systems and Slaughterhouses in Denmark. *Antibiotics*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111602>
- Chouikha, I., Bree, A., Moulin-Schouleur, M., Gilot, P., & Germon, P. (2008). Differential expression of *iutA* and *ibeA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. *Microbes and Infection*, 10(4), 432–438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.01.002>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- CLSI. (2025). *CLSI*. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de <https://clsi.org/>
- Cundon, C. C., Ameal, A., Maubecín, E., & Bentancor, A. (2018). Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from household dogs and cats in Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(3), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.003>

- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 12, pp. 3903–3910). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.911861>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Doublet, B., Douard, G., Targant, H., Meunier, D., Madec, J.-Y., & Cloeckaert, A. (2008). Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 359–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.010>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). *Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide*. <http://www.sfm.asso.fr/>
- EUCAST. (2025). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de <https://www.eucast.org/>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2024). <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-ECDC-WHO-executive-summary-2023-data.pdf>
- Flament-Simon, S.-C., Nicolas-Chanoine, M.-H., García, V., Duprilot, M., Mayer, N., Alonso, M. P., García-Meniño, I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2020). Clonal Structure, Virulence Factor-encoding Genes and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*, Causing Urinary Tract Infections and Other Extraintestinal Infections in Humans in Spain and France during 2016. *Antibiotics*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040161>
- 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.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., & Suzuki, T. (2006). Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Molecular Cell*, 21(1), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.001>
- Isel, C., Westhof, E., Massire, C., Le Grice, S. F. J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., & Marquet, R. (1999). Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription. *The EMBO Journal*, 18(4), 1038–1048–1048. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.1038>
- Jana, B., Cain, A. K., Doerrler, W. T., Boinett, C. J., Fookes, M. C., Parkhill, J., & Guardabassi, L. (2017). The secondary resistome of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 7(1), 42483. <https://doi.org/10.1038/srep42483>

- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., & et al. (2000). Molecular Epidemiological and Phylogenetic Associations of Two Novel Putative Virulence Genes, *iha* and *ironE. coli*, among *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5), 3040–3047. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.3040-3047.2000>
- 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., 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. <https://doi.org/10.1128/iai.65.6.2153-2159.1997>
- 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. <https://doi.org/10.1086/315217>
- 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>
- Kambampati, R., & Lauhon, C. T. (2003). MnmA and IscS Are Required for in Vitro 2-Thiouridine Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 42(4), 1109–1117. <https://doi.org/10.1021/bi026536+>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). Avian pathogenic *Escherichia coli* (Apec): An overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
- Kumar, A., & Kumar, A. (2021). Antibiotic resistome of *Salmonella typhi*: molecular determinants for the emergence of drug resistance. *Frontiers of Medicine*, 15(5), 693–703. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0777-6>
- Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Issue 10, pp. 1486–1513). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>
- Le Bouguéneq, 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>
- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: Risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. In *Therapeutic Advances in Drug Safety* (Vol. 5, Issue 6, pp. 229–241). <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Mahmoud, A. T., Ibrahim, R. A., Salim, M. T., Gabr, A., & Halby, H. M. (2020). Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli*

- isolates recovered from cancer patients. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 23, pp. 211–216). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>
- Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. D. (2019). Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (Expec) lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18>
- Martínez, M. J., & Alonso, A. C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Mora, A., López, C., Herrera, A., Viso, S., Mamani, R., Dhahi, G., Alonso, M. P., Blanco, M., Blanco, J. E., & Blanco, J. (2012). Emerging avian pathogenic *Escherichia coli* strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. *Veterinary Microbiology*, 156(3), 347–352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.033>
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., & Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3), 506–512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.007>
- 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>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 7, pp. 524–534). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Noma, A., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009). Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Research*, 37(4), 1335–1352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1023>
- Numata, T., Ikeuchi, Y., Fukai, S., Adachi, H., Matsumura, H., Takano, K., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Sasaki, T., Suzuki, T., & Nureki, O. (2006). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tRNA thiolation enzyme MnmA from *Escherichia coli* complexed with tRNA Glu. *Acta Crystallographica Section F*, 62(4), 368–371. <https://doi.org/10.1107/S174430910600738X>
- Papich, M. G. (2016). Cefotaxime Sodium. In M. G. Papich (Ed.), *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)* (pp. 124–126). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00139-X>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Issue 4, pp. 493–512). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- 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.
<https://doi.org/10.1128/aac.41.3.647>
- Reid, C. J., Cummins, M. L., Börjesson, S., Brouwer, M. S. M., Hasman, H., Hammerum, A. M., Roer, L., Hess, S., Berendonk, T., Nešporová, K., Haenni, M., Madec, J.-Y., Bethe, A., Michael, G. B., Schink, A.-K., Schwarz, S., Dolejska, M., & Djordjevic, S. P. (2022). A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nature Communications*, 13(1), 683. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28342-4>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Saidenberg, A. B. S., Edslev, S. M., Hallstrøm, S., Rasmussen, A., Park, D. E., Aziz, M., B, dos S. Q., Baptista, A. A. S., Barbosa, F., Rocha, V. G. P., M, van V. A. H., Dalsgaard, A., Price, L. B., Knöbl, T., & Stegger, M. (2024). *Escherichia coli* ST117: exploring the zoonotic hypothesis. *Microbiology Spectrum*, 12(10), e00466-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00466-24>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016(1), 2475067. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Shigi, N. (2014). Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in Genetics*, Volume 5-2014. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00067>
- Silke, L. (2024). 2-Thiouridine formation in *Escherichia coli*: a critical review. *Journal of Bacteriology*, 207(1), e00420-24. <https://doi.org/10.1128/jb.00420-24>
- Soler Bistué, E., Navarro Fuster, F., Ruiz de Alegria Puig, J., Martínez-Martínez, L., García Arenzana, J. M., & Mirelis García, B. (2000). *Salmonella enterica* Serovar Virchow with CTX-M-Like β -Lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4676–4678. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.12.4676-4678.2000>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & Mobley, H. L. T. (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>
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Urbonavičius, J., Qian, Q., Durand, J. M. B., Hagervall, T. G., & Björk, G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *The EMBO Journal*, 20(17), 4863–4873–4873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4863>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>

- World Health Organization*. (2023, October 23). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health>
- Xia, F., Jiang, M., Wen, Z., Wang, Z., Wang, M., Xu, Y., Zhuge, X., & Dai, J. (2022). Complete genomic analysis of ST117 lineage extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) to reveal multiple genetic determinants to drive its global transmission: ST117 *E. coli* as an emerging multidrug-resistant foodborne ExPEC with zoonotic potential. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(6), 3256–3273. <https://doi.org/10.1111/tbed.14678>
- 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>
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ueda, T., Ohta, S., & Watanabe, K. (2000). Defect in modification at the anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNA^{Lys} with the MERRF encephalomyopathy pathogenic mutation. *FEBS Letters*, 467(2–3), 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01145-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01145-5)
- Yibing, M., Mattia, P., Bimal, J., Hundtofte, M. V., & Luca, G. (2024). The intrinsic macrolide resistome of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(8), e00452-24. <https://doi.org/10.1128/aac.00452-24>