



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Iyana Baños Martínez

Caracterización de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) multirresistentes a los antibióticos de origen animal

Caracterización de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* patóxenos extraintestinais multirresistentes aos antibióticos de orixe animal

Characterization of plasmids from extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains multiresistant to antibiotics of animal origin

Traballo Fin de Grao

06/2025

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	9
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Escherichia coli</i> como patógeno	9
<i>Escherichia coli</i> patógeno extraintestinal (ExPEC)	10
<i>Escherichia coli</i> patógeno aviar (APEC).....	10
<i>Escherichia coli</i> uropatógeno (UPEC).....	11
<i>Escherichia coli</i> Clon ST131.....	11
One Health	12
Elementos genéticos móviles y transferencia horizontal	13
Conjugación plasmídica	14
Clasificación plasmídica.....	15
El problema de la resistencia a los antibióticos	16
Resistencia a los antibióticos β -lactámicos.....	17
Resistencia a la colistina.....	18
Inhibidores de la conjugación como estrategia terapéutica.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
Hipótesis	20
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Medios de cultivo	21
Preparación de medios con antibióticos	21
Preparación medio mínimo sales M9 con glucosa	21
Origen de las cepas	22
Conservación de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	22
Caracterización fenotípica de las cepas donadoras y receptoras	23
Obtención de cultivos puros.....	23
Caracterización del perfil de resistencia.....	23
Determinación de los fenotipos BLEE y AmpC.....	24
Ensayos de conjugación	25
Primera conjugación	25
Segunda conjugación	27
Curvas de crecimiento y optimización de la conjugación	28
Curvas de crecimiento.....	28
Frecuencia de conjugación.....	28
Caracterización fenotípica de las cepas transconjugantes	32
Siembra en agar MacConkey Lactosa.....	32
Antibiogramas	32
Movilidad.....	32
Hemólisis	32

Caracterización molecular	32
Protocolo general de PCR.....	32
Preparación de los <i>primers</i>	33
Puesta a punto PCR	34
Caracterización molecular de las cepas	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Caracterización de cepas donadoras y receptoras	35
Caracterización fenotípica	35
Perfil de resistencia.....	36
Caracterización molecular de factores de virulencia	37
Ensayos de conjugación	38
Curva de crecimiento	38
Conjugaciones	39
Frecuencia de conjugación.....	40
Caracterización de las cepas transconjugantes	40
Caracterización fenotípica	41
Fenotipo.....	41
Perfil de resistencia	41
Caracterización molecular	42
¿Qué plásmidos se transfirieron?	43
Cepa LREC_153	43
Cepa LREC_154	45
Perspectivas futuras	46
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	55
Anexo I	55
Anexo II	57
Anexo III	59

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-HDA	Ácido 2-hexadecinoico (C ₁₆ H ₂₈ O ₂)
APEC	Del inglés, “ <i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i> ”
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido
BPPL	Del inglés, “ <i>Bacterial Priority Pathogens List</i> ”
CLSI	Del inglés, “ <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ”
COIN	Del inglés, “Conjugation Inhibitors”
DDST	Del inglés, “ <i>Double Disc Synergy Test</i> ”
dNTP	Del inglés, “ <i>Deoxynucleoside Triphosphates</i> ”
DPMT	Del inglés, “ <i>Degenerate Primer MOB Typing</i> ”
EGM	Elementos Genéticos Móviles
EUCAST	Del inglés, “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility</i> ”
ExPEC	Del inglés, “ <i>Extraintestinal Escherichia coli</i> ”
HGT	Del inglés, “ <i>Horizontal Gene Transfer</i> ”
InPEC	Del inglés, “ <i>Intestinal Pathogenic Escherichia coli</i> ”
LB	Luria-Broth
LREC	Laboratorio de Referencia de <i>Escherichia Coli</i>
MCR	Del inglés, “ <i>Mobilized Colistin Resistance</i> ”
MDR	Del inglés, “ <i>Multidrug Resistant</i> ”
MH	Mueller-Hinton
MIL	Del inglés, “ <i>Motility Indole Lysine Medium</i> ”
ML	MacConkey Lactosa
MLST	Del inglés, “ <i>Multilocus Sequence Typing</i> ”
MM	Medio mínimo sales M9 con Glucosa
MNEC	Del inglés, “ <i>Meningitis-associated Escherichia coli</i> ”
NGS	Del inglés, “ <i>Next Generation Sequencing</i> ”
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBRT	Del inglés, “ <i>PCR-Based Replicon Typing</i> ”
PCR	Del inglés, “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
Rpm	Revoluciones por minuto
SEPEC	Del inglés, “ <i>Sepsis-associated Escherichia coli</i> ”
SGS	Del inglés, “ <i>Second Generation Sequencing</i> ”
SNP	Del inglés, “ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ”

ssDNA	Del inglés, “ <i>Single-stranded DNA</i> ”
ST	Del inglés, “ <i>Sequence Type</i> ”
T4CP	Del inglés, “ <i>Type IV Coupling Protein</i> ”
T4SS	Del inglés, “ <i>Type IV Secretion System</i> ”
TGS	Del inglés, “ <i>Third Generation Sequencing</i> ”
TSA	Del inglés, “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
TSB	Del inglés, “ <i>Tryptic Soy Broth</i> ”
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPEC	Del inglés, “ <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> ”
UTI	Del inglés, “ <i>Urinary Tract Infection</i> ”
WGS	Del inglés, “ <i>Whole Genome Sequencing</i> ”

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS E ILUSTRACIONES

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización fenotípica de las potenciales cepas donadoras y de las cepas receptoras.....	35
Tabla 2. Antibiograma de las cepas potencialmente donadoras y receptoras analizadas mediante EUCAST y CLSI.	37
Tabla 3. Determinación de estatus ExPEC, APEC y UPEC de las cepas donadoras por PCR.....	38
Tabla 4. Frecuencia de conjugación de las cepas LREC_153 y LREC_154 en los medios LB y Medio mínimo sales M9 con glucosa durante la fase exponencial y estacionaria.	40
Tabla 5. Caracterización fenotípica de los transconjugantes y comparativa con los fenotipos de las cepas receptoras y donadoras.	41
Tabla 6. Comparativa de los antibiogramas de las cepas donadoras, receptoras y transconjugantes por los criterios CLSI y EUCAST.....	41
Tabla 7. Resultados de las PCR de diagnóstico realizadas a las cepas LREC_153, LREC_154, AAG1, MG1655 y las transconjugantes (153-AAG1, 153-MG1655, 154-AAG1 y 154-MG1655).....	42
Tabla 8. Tabla resumen de las características de los plásmidos presentes en las cepas LREC_153 y LREC_154 (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020).	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas donadoras.	39
--	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema del proceso de conjugación. Creada con BioRender.com.....	15
Ilustración 2. Prueba de doble disco de la cepa LREC_161.....	24
Ilustración 3. Prueba de discos combinados con inhibidor de la cepa LREC_161.	24
Ilustración 4. Esquema resumen de las dos conjugaciones bacterianas. Creada con BioRender.com.....	25
Ilustración 5. Esquema del protocolo de la primera conjugación. Creada con BioRender.com.....	27
Ilustración 6. Resumen esquemático del protocolo empleado para determinar la frecuencia de conjugación en diferentes condiciones. Creada con BioRender.com.....	31
Ilustración 7. Esquema del programa de PCR utilizado.	33

RESUMEN

Caracterización de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) multirresistentes a los antibióticos de origen animal

Los plásmidos son una de las principales razones de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia entre las cepas bacterianas. En este trabajo se ha estudiado la conjugación plasmídica y su frecuencia. Además, se llevó a cabo una caracterización genotípica y fenotípica de las cepas donadoras, de las receptoras y de los transconjugantes obtenidos, con el objetivo de analizar el papel de los plásmidos conjugativos en la fisiología de las células receptoras. Las potenciales cepas donadoras del proceso de conjugación han sido una colección de cepas de *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 clado B, de origen porcino. El hecho de que estas cepas, a pesar de su origen, pertenezcan a un clon típicamente asociado a humanos, como es el ST131 las convierte en un hallazgo inusual y de gran interés. Además, presentan los patotipos ExPEC, APEC y UPEC y son multirresistentes. Por su parte, las cepas receptoras fueron la MG1655 y la AAG1 (una variante mutante de MG1655), cepas comensales de *E. coli*.

Tanto el número de cepas donadoras que han sido capaces de llevar a cabo la conjugación como la cantidad de transconjugantes obtenidos, es decir, la frecuencia de conjugación, mostraron valores muy bajos. Solamente conjugaron 2 de las 9 potenciales cepas donadoras y todas con una frecuencia de conjugación menor al 0,001%. Los dos plásmidos que lograron transferirse pertenecían a las familias IncX4 e IncL/M y confirieron a las cepas receptoras resistencia a antibióticos que previamente no poseían: penicilinas y cefalosporinas de primera generación en ambos casos y, además, a la colistina en el caso del plásmido IncX4, demostrando la implicación de este mecanismo en la diseminación de la resistencia.

A pesar de estas bajas frecuencias de transferencia observadas *in vitro*, la transferencia horizontal de plásmidos sigue siendo uno de los principales mecanismos responsables de la diseminación de genes entre poblaciones bacterianas, facilitando su propagación entre distintos hospedadores y nichos ecológicos. En este contexto, el bloqueo de componentes de la conjugación se ha propuesto como una estrategia prometedora para frenar la diseminación de la resistencia a los antibióticos mediada por plásmidos. En general, los hallazgos de este estudio respaldan la necesidad de profundizar en la comprensión de los mecanismos involucrados en la conjugación bacteriana en cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales, con el fin de evaluar la viabilidad de esta estrategia desde un enfoque *One Health*.

Palabras clave: *Escherichia coli*, ST131, porcino, ExPEC, APEC, UPEC, conjugación plasmídica, caracterización plasmídica, resistencia a antibióticos, cepas multirresistentes, *One Health*.

RESUMO

Caracterización de plásmidos de cepas de *Escherichia coli* patóxenos extraintestinais multirresistentes aos antibióticos de orixe animal

Os plásmidos son unha das principais razóns para a diseminación de xenes de resistencia a antibióticos e factores de virulencia entre as cepas bacterianas. Este traballo estudou a conxugación de plásmidos e a súa frecuencia. Ademais, realizouse unha caracterización xenotípica e fenotípica das cepas doadoras, das receptoras e dos transconxugantes obtidos, co obxectivo de analizar o papel dos plásmidos conxugativos na fisioloxía das células receptoras. As potenciais cepas doadoras do proceso de conxugación foron unha colección de cepas de *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 clado B, de orixe porcino. O feito de que estas cepas, a pesar da súa orixe, pertencen a un clon típicamente asociado cos humanos, como ST131, convérteas nun achado inusual e de gran interese. Ademais, presentan os patotipos ExPEC, APEC e UPEC e son multirresistentes. As cepas receptoras foron MG1655 e AAG1 (unha variante mutante de MG1655), cepas comensais de *E. coli*.

Tanto o número de cepas doadoras capaces de conxugar como a cantidade de transconxugantes obtidos, é dicir, a frecuencia de conxugación, amosaron valores moi baixos. Só dúas das nove cepas doadoras potenciais conxugaron, e todas cunha frecuencia de conxugación inferior ao 0,001%. Os dous plásmidos que se transferiron con éxito pertencían ás familias IncX4 e IncL/M e confirían resistencia a antibióticos non presentes previamente nas cepas receptoras: penicilinas e cefalosporinas de primeira xeración en ambos os casos, e colistina no caso do plásmido IncX4, o que demostra a implicación deste mecanismo na propagación da resistencia.

A pesar destas baixas frecuencias de transferencia observadas *in vitro*, a transferencia horizontal de plásmidos segue a ser un dos principais mecanismos responsables da diseminación de xenes entre as poboacións bacterianas, facilitando a súa propagación a través de diferentes hóspedes e nichos ecolóxicos. Neste contexto, propúxose o bloqueo dos compoñentes de conxugación como unha estratexia prometedor para frear a propagación da resistencia a antibióticos mediada por plásmidos. En xeral, os resultados deste estudo apoian a necesidade de comprender mellor os mecanismos implicados na conxugación bacteriana en cepas *E. coli* que causan infeccións extraintestinais, co fin de avaliar a viabilidade desta estratexia desde a perspectiva *One Health*.

Palabras chave: *Escherichia coli*, ST131, porcino, ExPEC, APEC, UPEC, conxugación plasmídica, caracterización plasmídica, resistencia a antibióticos, cepas multirresistentes, *One Health*.

SUMMARY

Characterization of plasmids from extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains multiresistant to antibiotics of animal origin

Plasmids are one of the main reasons for the dissemination of antibiotic resistance genes and virulence factors among bacterial strains. This study analyzed plasmid conjugation and its frequency. Furthermore, genotypic and phenotypic characterization of the donor and recipient strains and the resulting transconjugants was performed to analyze the role of conjugative plasmids in the physiology of recipient cells. The potential donor strains for the conjugation process were a collection of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 clade B strains of porcine origin. The fact that these strains, despite their origin, belong to a clone typically associated with humans, such as ST131, makes them an unusual and highly interesting find. Furthermore, they present the ExPEC, APEC and UPEC pathotypes and are multidrug-resistant. The recipient strains were MG1655 and AAG1 (a mutant variant of MG1655) commensal strains of *E. coli*.

Both the number of donor strains capable of conjugation and the number of transconjugants obtained, i.e., the conjugation frequency, showed very low values. Only two of the nine potential donor strains conjugated, and all with a conjugation frequency of less than 0.001%. The two plasmids that were successfully transferred belonged to the IncX4 and IncL/M families and conferred resistance to antibiotics not previously present in the recipient strains: penicillins and first-generation cephalosporins in both cases, and colistin in the case of the IncX4 plasmid, demonstrating the involvement of this mechanism in the spread of resistance.

Despite these low transfer frequencies observed *in vitro*, horizontal plasmid transfer remains one of the main mechanisms responsible for gene dissemination among bacterial populations, facilitating their spread across different hosts and ecological niches. In this context, blocking conjugation components has been proposed as a promising strategy to curb the spread of plasmid-mediated antibiotic resistance. Overall, the findings of this study support the need to further understand the mechanisms involved in bacterial conjugation in *E. coli* strains that cause extraintestinal infections, in order to evaluate the feasibility of this strategy from a One Health perspective.

Keywords: *Escherichia coli*, ST131, porcine, ExPEC, APEC, UPEC, plasmid conjugation, plasmid characterization, antibiotic resistance, multiresistant strains, One Health.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli

La bacteria *Escherichia coli* fue aislada por primera vez en 1885 a partir de muestras fecales de recién nacidos por el pediatra alemán Theodor Escherich, quien nombró a esta nueva especie *Bacterium coli commune*. En 1958, fue reclasificada oficialmente como *Escherichia coli* (Basavaraju & Gunashree, 2022; Yu et al., 2021).

E. coli pertenece al género *Escherichia* y a la familia *Enterobacteriaceae*. Esta especie, formada por bacilos gramnegativos y móviles es sumamente versátil. Es una de las bacterias más prevalentes como comensal anaerobio facultativo en la microbiota del tracto gastrointestinal humano, colonizando el intestino del recién nacido pocas horas después del nacimiento, y siendo, por lo general, la primera especie en hacerlo. También se encuentra en otros animales de sangre caliente y reptiles. Además, *E. coli* tiene la capacidad de sobrevivir en hábitats abióticos, como el suelo, el agua, los sedimentos y los alimentos (Allocati et al., 2013; Kaper et al., 2004; Leimbach et al., 2013; Pokharel et al., 2023).

Dada la gran diversidad de clones o linajes presentes en esta especie, no es de extrañar que se hayan desarrollado distintas estrategias con el propósito de distinguir cepas patógenas de las comensales. El sistema de clasificación más ampliamente utilizado se basa en la identificación de antígenos de superficie, principalmente el polisacárido O (somático) y el antígeno H (flagelar), conformando el serotipo O:H. Aunque tradicionalmente también se consideraba al antígeno capsular K (O:K:H), su tipificación es menos común debido a limitaciones técnicas en muchos laboratorios. A la fecha, se han descrito aproximadamente 186 grupos de antígeno O y 53 tipos de antígeno H, lo que refleja la diversidad serotípica de *E. coli* (Fratamico et al., 2016). Además, existen otros sistemas de clasificación molecular basados en la detección de variantes genéticas en combinaciones de alelos altamente conservados, lo que permite establecer secuencias tipo (ST) siguiendo el esquema MLST (Wirth et al., 2006), o esclarecer linajes evolutivos mediante el esquema de grupos filogenéticos de Clermont (Clermont et al., 2019).

E. coli se ha consolidado como uno de los organismos modelo más estudiados en microbiología y biología molecular (Blount, 2015). Su gran diversidad genética la convierte en el candidato ideal para el estudio de procesos evolutivos y mecanismos de adaptación de las diferentes cepas, además de usarse como indicador de contaminaciones fecales (Leimbach et al., 2013).

Escherichia coli como patógeno

Habitualmente, *E. coli* se comporta como un comensal inofensivo estableciendo una relación simbiótica con sus hospedadores. Sin embargo, algunas cepas en determinados casos, como en pacientes inmunodeprimidos, son patógenos oportunista y pueden causar graves infecciones (Kaper et al., 2004). Además, la presión evolutiva ha llevado a ciertas variantes de la especie a alejarse del estilo comensal y adoptar un estilo de vida

de patógeno obligado, desarrollando la capacidad de causar enfermedades, independientemente de la condición del hospedador (Leimbach et al., 2013).

Las cepas patógenas se dividen en 2 grandes grupos: *E. coli* patógenos intestinales (InPEC) y *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000). Dentro de las cepas ExPEC, encargadas de producir infecciones extraintestinales, se encuentran los patotipos: *E. coli* uropatógeno (UPEC), *E. coli* asociado a meningitis (MNEC), *E. coli* asociado a septicemia (SEPEC) y *E. coli* patógeno aviar (APEC). Un patotipo es un grupo de cepas de una misma especie que comparten ciertas características de virulencia, como son la manifestación clínica de la enfermedad, los factores de virulencia implicados y el origen filogenético de las cepas (Leimbach et al., 2013).

No obstante, una cepa no está restringida a ser relacionada con un único patotipo. Se han identificado cepas híbridas caracterizadas por cumplir los criterios de diferentes patotipos, de manera que, estas cepas poseen la capacidad de infectar diferentes especies hospedadoras y causar distintas enfermedades según el lugar de infección (Pokharel et al., 2023; Whelan et al., 2023).

Escherichia coli patógeno extraintestinal (ExPEC)

Las cepas ExPEC son parte de la microbiota intestinal y suelen colonizar el intestino de manera asintomática. Sin embargo, son patógenos facultativos, de manera que, una vez acceden a nichos fuera del intestino, son capaces de colonizarlos y causar diversas enfermedades extraintestinales, entre ellas: infecciones del tracto urinario (UTIs, del inglés *Urinary Tract Infection*), septicemia o meningitis neonatal en seres humanos y animales (Köhler & Dobrindt, 2011). Este grupo de patógenos se caracteriza por presentar una amplia gama de factores de virulencia y una gran plasticidad genómica, lo que les confiere un elevado poder patogénico, permitiendo incluso a algunas cepas infectar a múltiples especies hospedadoras (Haboria et al., 2019; Pokharel et al., 2023).

La relación entre las cepas comensales y las cepas ExPEC es compleja, con una línea divisoria poco definida. Es frecuente que cepas comensales presenten factores de adaptación (*fitness*) muy similares a los factores de virulencia característicos de ExPEC, y que muchas características asociadas a la patogenicidad extraintestinal estén presentes en cepas no patógenas (Leimbach et al., 2013). Esta incapacidad de diferenciar claramente entre las cepas ExPEC y las comensales suma pruebas al hecho de que las cepas ExPEC son patógenos facultativos (Köhler & Dobrindt, 2011).

Escherichia coli patógeno aviar (APEC)

Las cepas APEC pueden causar infecciones locales y sistémicas en aves (colibacilosis sistémica, que incluye pericarditis, aerosaculitis y septicemia). La entrada del patógeno suele ser por vía respiratoria, aunque también pueden ocurrir por vía oral o a través de lesiones. Los factores de virulencia característicos de APEC son: adhesinas, invasinas, protectinas, sistemas de adquisición de hierro y de producción de toxinas (Kathayat et al., 2021).

Si bien APEC es un patotipo asociado a aves, su correlación filogenética con las cepas ExPEC y la presencia de genes con capacidad de provocar UTIs y meningitis en modelos murinos en estas cepas, parecen confirmar que APEC es un patógeno zoonótico relevante para la salud pública (Kathayat et al., 2021; Pokharel et al., 2023). Entre otros, se han encontrado cepas *E. coli* con características genéticas y de virulencia de APEC en aislados de origen porcino (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020), confirmando que otras especies también pueden servir como reservorio para estas cepas.

Escherichia coli uropatógeno (UPEC)

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) son unas de las infecciones bacterianas más comunes que afectan tanto a humanos como a animales (Denamur et al., 2021), siendo causadas principalmente por *E. coli* uropatógeno (UPEC). Las cepas UPEC cuando acceden a las células epiteliales de la uretra, son capaces de ascender a la vejiga e incluso a los riñones para causar la infección (Whelan et al., 2023).

Las cepas UPEC albergan múltiples factores de virulencia, incluidos determinantes de adhesión. Su persistencia en el tracto urinario se asocia a una gran flexibilidad metabólica y capacidad de adaptación. Características que les permiten sobrevivir tanto en el intestino como en el sistema urinario. Por ejemplo, aproximadamente el 40-50% de las *E. coli* aisladas de pacientes con UTI codifican una toxina conocida como α -hemolisina (HlyA) (Hannan et al., 2008). Esta toxina, con capacidad hemolítica y formadora de poros (Wiles & Mulvey, 2013), es esencial para modular la exfoliación de células del hospedador y aumentar la aptitud de UPEC durante las UTIs agudas (Nagamatsu et al., 2015).

Escherichia coli Clon ST131

ST131 es una de las secuencias tipo (ST) más diversas de *E. coli*. Se divide en linajes o clados (A, B y C), y pertenece al filogrupo B2, el cual está fuertemente asociado a ExPEC y al perfil de resistencia a antibióticos BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) (Denamur et al., 2021; Köhler & Dobrindt, 2011; Pokharel et al., 2023; Shahbazi et al., 2023).

Los clones de ST131 pueden ser comensales o patógenos y se han encontrado en muestras humanas, alimentarias, ambientales y animales, tanto de compañía como de ganadería (Reid et al., 2019). A pesar de existir aislados ST131 comensales, las cepas patógenas ST131 son unas de las más prevalentes, y son consideradas cepas epidémicas, estando relacionados con infecciones urinarias y sanguíneas. Aunque se desconoce la razón de esta elevada prevalencia, la hipótesis principal señala la combinación de resistencia a antibióticos, no solo a los de rutina, sino también a los de último recurso, junto con la presencia de numerosos factores de virulencia (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020; Pokharel et al., 2023; Shahbazi et al., 2023). Es decir, ST131 es un clon multirresistente (MDR) altamente virulento, en especial los serotipos O25b:H4 y O16:H5. El resistoma, o conjunto de genes de resistencia de ST131, se encuentra principalmente vehiculado por plásmidos flanqueados por elementos genéticos móviles. Esto permite que los genes de resistencia puedan

ser ganados o perdidos por las bacterias en función de la ventaja adaptativa que esto pueda suponer (Decano et al., 2021).

El clon ST131 es un patógeno típico de humanos, por lo que su presencia es mucho más habitual en humanos que en animales (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). De hecho, se considera que la presencia de estos clones en animales podría tener un origen humano. Independientemente de su causa, la detección de este patógeno típicamente humano en animales destinados a la producción de alimentos representa un riesgo significativo para la salud pública, al actuar como reservorio y posible vehículo de transmisión a lo largo de la cadena alimentaria (Reid et al., 2019).

One Health

La incidencia de ExPEC en cerdos ha aumentado en los últimos años, consolidándose como un patógeno relevante en la industria porcina, con importantes repercusiones económicas y sanitarias (Despotovic et al., 2023; Ma et al., 2021). No obstante, la importancia de tratar estas infecciones en cerdos va más allá de la salud animal, bajo el enfoque *One Health* (una sola salud), este problema repercute directamente en la salud humana y la seguridad alimentaria (Poirel et al., 2018; Pomba et al., 2017).

El concepto *One Health* surgió en 2004 a partir del concepto *One Medicine* y reconoce la interconexión entre la salud humana, animal y de ecosistemas; así como el fuerte impacto que tiene cada una de ellas en las otras y la importancia de crear estrategias globales para solucionar problemas (Destoumieux-Garzón et al., 2018). Este enfoque es especialmente importante en la lucha contra *E. coli* patógeno, dado su elevado potencial zoonótico y su papel en la diseminación de la resistencia a antibióticos (Wasteson, 2001).

Un claro ejemplo de la interconexión entre la salud humana, animal y ambiental se ve en el aumento de resistencia a antibióticos en humanos en los últimos años, entre otros motivos, por el uso indebido de antibióticos en ganadería. De hecho, la aparición de resistencia a la colistina en cepas humanas tiene su origen en el uso de este antibiótico en ganaderías porcinas (Reid et al., 2019). Estas resistencias son vehiculadas por *E. coli* y diseminadas a través del estiércol o aguas residuales de granjas. De manera que, una persona podría adquirir genes de resistencia consumiendo vegetales que han sido cultivados con dicho estiércol o aguas residuales. Además, aunque los tejidos comestibles de animales sanos se consideran estériles, en ocasiones, en el proceso de preparación pueden producirse contaminaciones con materia fecal del paquete intestinal durante el eviscerado (Monger et al., 2021).

Esto, entre muchos otros hechos, demuestra la necesidad de orientar la visión de los tratamientos hacia un enfoque *One Health* y tomar decisiones siempre teniendo en cuenta esta interconexión.

Elementos genéticos móviles y transferencia horizontal

La diversidad genómica de *E. coli*, esencial para su variabilidad fenotípica y metabólica, se sustenta en la interacción entre un genoma central (*core genome*) —compuesto por genes esenciales compartidos por todas las cepas— y un genoma flexible, integrado por genes presentes solo en determinadas cepas, que permiten su adaptación a distintos nichos ecológicos. Este genoma flexible incluye diversos elementos genéticos móviles (EGM) como plásmidos, islas genómicas y bacteriófagos, que en conjunto forman el mobiloma y a menudo codifican factores de virulencia y adaptación (*fitness*), claves para la patogenicidad. La suma del genoma central y el flexible constituye el pangenoma de la especie que puede ser transmitido verticalmente durante los procesos de replicación bacteriana (Leimbach et al., 2013).

Otra forma de diseminación de genes es la transferencia horizontal (HGT) entre diferentes cepas, originando nuevas variantes y cepas patógenas (Pokharel et al., 2023). Básicamente, consiste en la integración por una bacteria de ADN externo (Munita & Arias, 2016). Se conocen tres mecanismos clásicos de transferencia horizontal: transformación, transducción y conjugación, siendo la conjugación el más común (Smillie et al., 2010).

Entre los componentes del mobiloma, los plásmidos destacan como vehículos clave de HGT entre bacterias. Anteriormente denominados “episomas”, pasaron a llamarse plásmidos en 1952 gracias al biólogo molecular Joshua Lederberg (Garcillán-Barcia et al., 2023). Se trata de moléculas de ADN circular de doble cadena, de tamaño variable, que pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora. Su genoma está formado por genes esenciales para su replicación —conocidos como genes *backbone*—, junto con genes accesorios que proporcionan ventajas adaptativas, como resistencia a antibióticos o factores de virulencia, a las cepas hospedadoras (Couturier et al., 1988; Orlek, Phan, et al., 2017).

Los plásmidos están estrechamente vinculados a los diferentes patotipos bacterianos, ya que a menudo portan determinantes de virulencia y resistencia antimicrobiana característicos de estos perfiles (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020; Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Phan, et al., 2017; Pokharel et al., 2023). Por ejemplo, en ExPEC, muchos de sus genes de virulencia se encuentran en islas de patogenicidad (PAIs) y plásmidos (Leimbach et al., 2013). Esta asociación refuerza la teoría de la evolución de la virulencia, la cual propone que puede surgir, al menos en parte, por la HGT de elementos genéticos móviles, entre los que los plásmidos juegan un papel central (Denamur et al., 2021).

Se estima que casi todas las cepas de *E. coli* albergan entre dos y cuatro plásmidos. Además, en esta especie, tanto la adquisición como la pérdida de genes a través de HGT es un fenómeno frecuente, lo que genera una gran variabilidad en la capacidad patogénica incluso entre cepas del mismo linaje filogenético (Denamur et al., 2021; Leimbach et al., 2013).

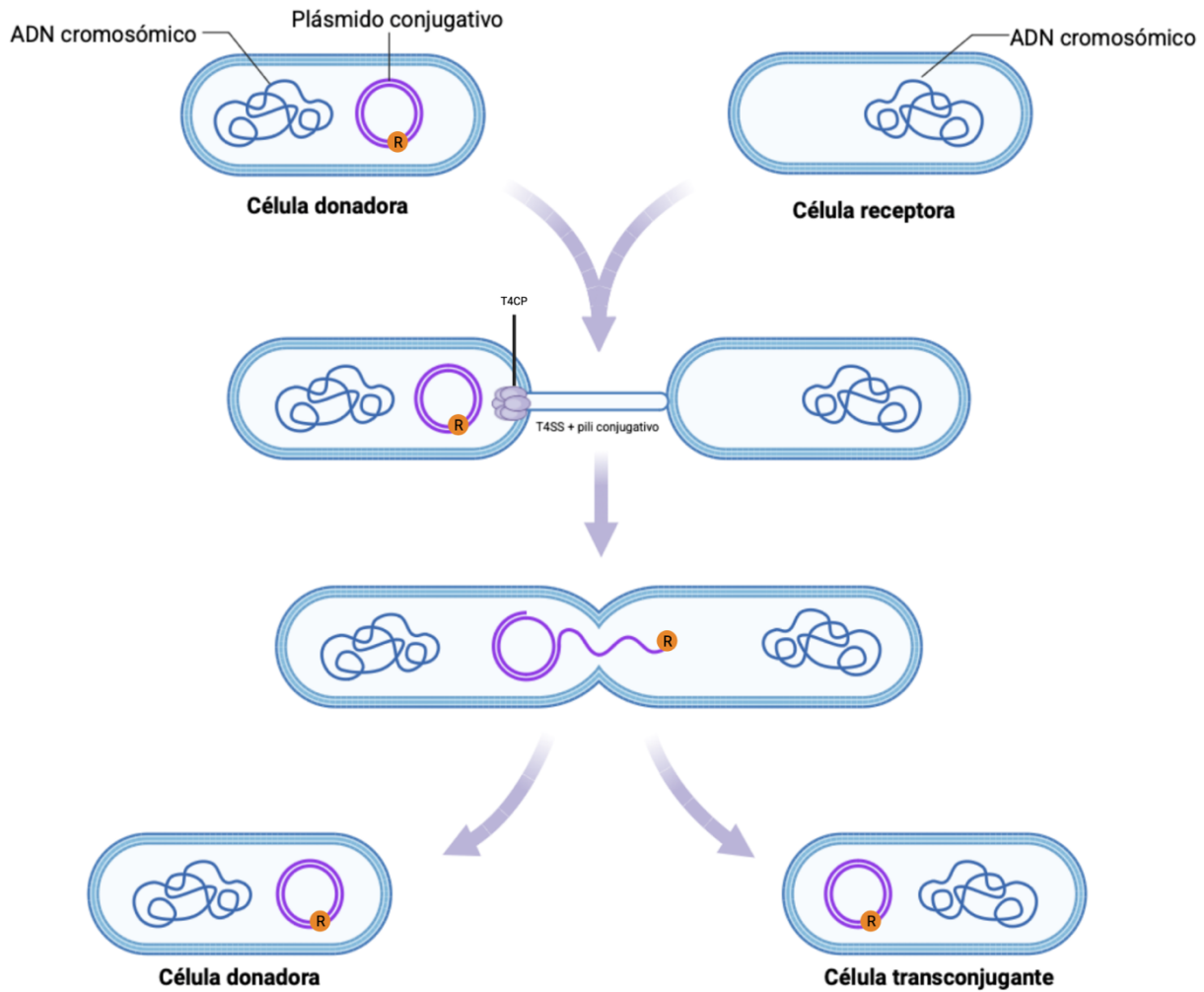
Conjugación plasmídica

La conjugación bacteriana fue descrita por primera vez en 1946 por Edward Tatum y Joshua Lederberg (Virolle et al., 2020). Este proceso es la principal ruta para que los plásmidos, uno de los principales transmisores de genes, alcancen nuevas bacterias o incluso células eucariotas (Denamur et al., 2021; Garcillán-Barcia et al., 2011; Smillie et al., 2010).

Según su capacidad de movilidad entre bacterias los plásmidos se pueden clasificar en: conjugativos, movilizables y no movilizables. Los plásmidos conjugativos portan los genes necesarios para transferirse por conjugación. Los plásmidos movilizables son aquellos que no posee la maquinaria de genes conjugativos, pero se pueden transferir usando los genes de un plásmido conjugativo presente en la bacteria hospedadora. Los plásmidos no movilizables son aquellos que no son conjugativos ni movilizables y la única forma que tienen de transferirse es mediante transformación natural o transducción (Smillie et al., 2010). Los plásmidos conjugativos se encuentran generalmente en un número de copias mucho más bajo que los movilizables (Garcillán-Barcia et al., 2011). Otra diferencia es su tamaño, pues los plásmidos conjugativos son mucho más grandes que los movilizables (Denamur et al., 2021).

Esta diferencia de tamaño es debida a que, los plásmidos conjugativos presentan genes que codifican proteínas necesarias para el proceso de conjugación (genes *tra*): las proteínas del pili conjugativo, el sistema de secreción tipo IV (T4SS), la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP), una relaxasa y proteínas auxiliares de escisión. El pili conjugativo asociado al T4SS permite captar bacterias receptoras, siendo esencial para la determinación del rango de hospedadores que puede infectar el plásmido. Por otro lado, la relaxasa produce un corte en el origen de transferencia (*oriT*), liberando una hebra monocatenaria (hebra T), a la cual se une. Mientras la hebra del plásmido que permanecerá en la cepa receptora comienza a replicarse, el complejo de la hebra T y relaxasa interacciona con T4SS, gracias a T4CP, para su transferencia a la célula receptora. Una vez en la bacteria receptora, la hebra T ssDNA (del inglés, *single-stranded* DNA) se recirculariza con ayuda de la relaxasa y se sintetiza la otra hebra, formando el plásmido de doble cadena (Ilustración 1). Por su parte, los plásmidos movilizables solo tienen los componentes del relaxosoma: *oriT*, relaxasa y proteínas de escisión, de manera que, dependen de la maquinaria de transferencia de un plásmido conjugativo co-residente para poder movilizarse (Smillie et al., 2010; Virolle et al., 2020).

Ilustración 1. Esquema del proceso de conjugación. Creada con BioRender.com



La bacteria donadora porta el plásmido conjugativo que contiene los genes necesarios para sintetizar: el **pili conjugativo**, el **T4SS** (sistema de secreción tipo IV), el **T4CP** (proteína de acoplamiento tipo IV) y la **R** (relaxasa). De manera que, el pili + T4SS captan una potencial bacteria receptora, activando el mecanismo de transferencia del plásmido. Por tanto, el resultado final es la presencia del plásmido en la bacteria donadora y receptora, la cual pasa a ser una bacteria transconjugante con capacidad de transferir el plásmido a una nueva bacteria receptora.

En la imagen no se muestra como la hebra T en la cepa transconjugante y la hebra restante que permanece en la cepa donadora se replican para sintetizar la doble cadena de ADN que forma el plásmido.

Clasificación plasmídica

Actualmente, la clasificación plasmídica se basa en sus funciones de replicación y movilización. La tipificación de replicón se basa en el análisis del origen u orígenes de replicación del plásmido (tipado en grupos de incompatibilidad o Inc), mientras que la tipificación de relaxasas se basa en el análisis de la relaxasa, proteína encargada del corte del origen de transferencia del plásmido y de la transferencia del ADN plasmídico de la bacteria donadora a la receptora (tipado de relaxasas o MOB) (Garcillán-Barcia et al., 2023). Las familias Inc pueden englobarse dentro de las familias MOB, por lo que ambas clasificaciones están estrechamente relacionadas, aunque hay excepciones, generalmente se usan ambas clasificaciones en conjunto para caracterizar e identificar plásmidos (Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Phan, et al., 2017).

Ambos tipos de clasificaciones se pueden caracterizar por PCR: PBRT (tipado de replicones por PCR) y DPMT (tipado de relaxasas por PCR). Mientras que el método PRBT permite identificar un mayor número de

plásmidos— ya que todos poseen al menos un origen de replicación—, el método DPMT se aplica exclusivamente a plásmidos transmisibles (movilizables o conjugativos), dado que solo estos portan genes de relaxasa. En este contexto, la clasificación basada en grupos MOB ofrece mayor sensibilidad, al estar los genes *MOB* más conservados y presentes en copia única por plásmido; sin embargo, presenta menor resolución que la clasificación Inc, ya que únicamente detecta plásmidos con capacidad de transferencia (Garcillán-Barcia et al., 2011; Orlek, Phan, et al., 2017; Villa & Carattoli, 2020).

La clasificación MOB se divide en 6 familias: MOBF, MOBH, MOBQ, MOBC, MOBP y MOBV. Mientras que MOBF y MOBH están generalmente asociados a plásmidos conjugativos. MOBP y MOBQ están asociados a plásmidos tanto conjugativos como movilizables y MOBC y MOBV a plásmidos movilizables. Por otro lado, MOBP y MOBQ están asociados a plásmidos de todos los tamaños, mientras que MOBF y MOBH a plásmidos grandes, MOBC está presente en plásmidos medianos y MOBV en pequeños. Por tanto, como se comentó anteriormente, el tamaño de los plásmidos se encuentra relacionado con su capacidad conjugativa (Smillie et al., 2010), lo cual tiene sentido pues los plásmidos conjugativos portan todos los genes que codifican para la maquinaria que les permite transferirse (Virolle et al., 2020) y, por tanto, su tamaño será mayor.

Por otro lado, la clasificación Inc, se refiere a los grupos de incompatibilidad, basada en el hecho de que los plásmidos pertenecientes al mismo grupo no pueden estar en el mismo hospedador simultáneamente por incompatibilidad entre sus sistemas de replicación. El sistema tradicional basado en pruebas de incompatibilidad está en desuso, debido a que estas pruebas solo pueden aplicarse a un número limitado de aislados bacterianos y por tratarse de un proceso muy laborioso. Si bien estas pruebas fueron sustituidas por el tipado de replicón, la notación Inc se sigue conservando (Garcillán-Barcia et al., 2023; Villa & Carattoli, 2020).

El problema de la resistencia a los antibióticos

El aumento de la resistencia a antibióticos es un problema de salud pública y animal que cada vez está ganando más importancia a nivel global. Este aumento drástico es debido a: i) el uso excesivo de antimicrobianos en salud humana y animal, ii) uso excesivo de antimicrobianos en la industria ganadera y en la producción de alimentos, iii) aumento de los viajes internacionales y la globalización del comercio (Allocati et al., 2013; Monger et al., 2021; Pokharel et al., 2023) y iv) presencia de genes de resistencia en el medio ambiente que son adquiridos por cepas que infectan a humanos y animales (Garcillán-Barcia et al., 2011; Munita & Arias, 2016).

Uno de los hechos más preocupantes es que si bien se ha observado la disminución o desaparición de la resistencia a un antimicrobiano tras dejar de usarlo, esta puede reaparecer fácilmente al retomar su consumo. Esto se debe a un proceso de selección natural en el que las bacterias sensibles mueren al exponerse de nuevo al antibiótico, permitiendo que las bacterias resistentes se multipliquen rápidamente ante la ausencia de competencia (Garcillán-Barcia et al., 2011).

Se estima que para 2050 la resistencia a antibióticos causara 10 millones de muertes al año (Pokharel et al., 2023) y una pérdida de 100 trillones de dólares de la economía global (Munita & Arias, 2016). Entre las bacterias más preocupantes por su aumento de resistencia a antibióticos se encuentra *E. coli*, que ha sido incluida como un grupo crítico en la lista de patógenos bacterianos prioritarios (BPPL del inglés, *Bacterial Priority Pathogens List*) publicada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2024 (Organization, 2024).

La adquisición de estas resistencias por parte de cepas patógenas aumenta la dificultad de tratamiento y presenta desafíos a la hora de controlar infecciones, reduciendo de forma drástica las posibilidades de tratamiento, llegando en casos extremos a la ausencia total de alternativas (Munita & Arias, 2016).

Los genes de resistencia se encuentran comúnmente en plásmidos y se diseminan mediante conjugación (Leimbach et al., 2013); una vía de diseminación especialmente común en *E. coli* (Orlek, Phan, et al., 2017). Además, algunos de los plásmidos portadores de genes de resistencia, tienen la capacidad de transferirse a distintos hospedadores, lo que ha provocado nuevos brotes de bacterias multirresistentes (MDR, del inglés *Multidrug Resistant*) (Garcillán-Barcia et al., 2011). La carga sanitaria global provocada por *E. coli* MDR es significativa, con infecciones que conllevan altas tasas de morbilidad y mortalidad, además de un coste económico de miles de millones de dólares anuales. En este contexto, existe la urgente necesidad de desarrollar nuevas medidas preventivas y ganar conocimiento en los mecanismos involucrados en la dispersión de estos genes de resistencia (Pokharel et al., 2023).

Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son una gran categoría que incluye penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Whelan et al., 2023). Son el tratamiento más común contra infecciones, lo que ha llevado a que las resistencias adquiridas a esta familia de antibióticos estén en la actualidad ampliamente extendidas (Shaikh et al., 2015).

Las β -lactamasas son el principal mecanismo de defensa de las bacterias contra los antibióticos betalactámicos. Se trata de enzimas bacterianas capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico del antibiótico, inhibiendo su actuación. Los genes que codifican para estas enzimas se denominan *bla* seguido del nombre de la enzima específica (Munita & Arias, 2016).

Entre estas enzimas destacan las codificadas por los genes *blaTEM*, *blaCTX-M* y *blaSHV*. Los genes *blaTEM* y *blaSHV* pertenecen generalmente al grupo de las betalactamasas de espectro estrecho pues están relacionadas principalmente solo con la resistencia al grupo de las penicilinas y en el caso de *blaTEM* también a las cefalosporinas de 1º generación (Shaikh et al., 2015). Por su parte, *blaCTX-M* codifica para la familia más nueva de betalactamasas y confieren un fenotipo de resistencia de espectro extendido (BLEE), presentando resistencia también a monobactámicos y cefalosporinas de tercera generación, entre otros betalactámicos, además de una sensibilidad a inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico (Whelan et al., 2023).

Las betalactamasas se caracterizan por estar asociadas a plásmidos y por ello tener gran capacidad de diseminación. Por ejemplo, *blaCTX-M* está fuertemente asociado a los plásmidos IncF, famosos por su elevada transmisibilidad (Orlek, Phan, et al., 2017). La betalactamasa más preocupante actualmente es la codificada por el gen *blaCTX-M* pues está asociado con BLEE, por lo que su diseminación supone la adquisición de resistencia a un elevado número de antibióticos de uso frecuente en Enterobacterias como *E. coli*. Sin embargo, la diseminación de *blaSHV* o *blaTEM* es igual de preocupante, dado que por selección natural es probable que estos genes muten hacia fenotipos BLEE; de hecho, se ha visto, una subfamilia nueva de *blaTEM* conocida como *blaTEM-3* que muestra el fenotipo BLEE (Shaikh et al., 2015).

Resistencia a la colistina

La colistina (polimixina E) es un polipéptido policatiónico antimicrobiano descubierto en Japón en 1949, producido por *Bacillus polymyxa*. Pertenece a la clase de antibióticos conocidos como polimixinas, las cuales comprenden cinco compuestos químicos diferentes (polimixinas A–E) (Andrade et al., 2020). Es uno de los antibióticos más antiguos y, aunque originalmente fue de uso exclusivo veterinario, ha sido reclasificado por la OMS como una de las moléculas antimicrobianas de mayor prioridad para la medicina humana (Ahmed et al., 2025).

La polimixina E se emplea como antimicrobiano de último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes (MDR) gramnegativas, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Escherichia coli* (Sahoo et al., 2023).

Multitud de estudios muestran la expansión de la resistencia a colistina en los últimos años, debido principalmente al uso de este antimicrobiano en la ganadería, especialmente en cerdos, y en la producción de alimentos (Ahmed et al., 2025; Andrade et al., 2020; Flament-Simon, de Toro, et al., 2020; Ghasemian et al., 2018; Sahoo et al., 2023; Zhang et al., 2021), lo que supone una gran amenaza para la salud pública y veterinaria.

Los mecanismos de resistencia bacteriana a la colistina pueden ser mecanismos intrínsecos o adquiridos. Dentro de los mecanismos adquiridos destacan principalmente los cromosómicos y plasmídicos. Este último, es decir, la transmisión de la resistencia por medio de plásmidos es de gran importancia y es mediado por el gen *mcr* (del inglés, “mobilized colistin resistance”). El gen *mcr* fue identificado por primera vez en China a finales de 2015. Actualmente, hay 10 variables del gen conocidas (*mcr-1* a *mcr-10*) aisladas a partir de animales y humanos, siendo el más común *mcr-1* (Zhang et al., 2021). El gen *mcr-1.1* (subtipo del gen *mcr-1*) fue detectado en 5 de las 11 cepas objeto de estudio en este trabajo, presuntamente en un caso integrado en el cromosoma y en el resto vehiculado por plásmidos (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020).

Aunque el uso de la colistina se encuentra limitado, especialmente en humanos, debido a sus propiedades nefrotóxicas, se ha visto que ante cepas ST131 causantes de UTIs es el tratamiento más efectivo (Shahbazi et al., 2023). Por tanto, la presencia del gen *mcr-1.1* y su capacidad de diseminación es preocupante.

Inhibidores de la conjugación como estrategia terapéutica

E. coli como patógeno representa un gran desafío debido a su elevada importancia tanto en humanos como animales (Pokharel et al., 2023). Infecciones causadas por este patógeno provocan un elevado número de muertes y grandes pérdidas económicas al año. En 2019 se registraron 400 millones de casos de UTIs comúnmente causadas por cepas UPEC y un estudio europeo determinó que el coste por tratamiento es de 5700 euros/persona (Whelan et al., 2023). En el sector animal, también tiene un gran impacto sobre todo las cepas APEC en aves, representando para la industria avícola pérdidas económicas de cientos de millones de dólares a nivel mundial (Kathayat et al., 2021). Estos datos muestran la gran importancia del desarrollo de terapias efectivas para combatir este patógeno.

Los plásmidos, a través de la conjugación, son los responsables de la diseminación de factores de virulencia y genes de resistencia, llevando no solo a un aumento de cepas patógenas para una especie, sino que también se ha visto la capacidad de estas cepas de infectar diferentes especies debido a su potencial zoonótico (Pokharel et al., 2023).

Por tanto, es lógico pensar que una de las principales estrategias para frenar la diseminación de estos genes esté centrada en la inhibición de la conjugación de los plásmidos. Los inhibidores de la conjugación (COINs), pueden tener diferentes dianas: i) la bacteria receptora, ii) la maquinaria de conjugación y iii) la bacteria donadora (Graf et al., 2019).

i) Atacar a la bacteria receptora del plásmido. En un experimento reciente se diseñó un sistema CRISPR/Cas9 para atacar y eliminar el plásmido portador del gen *mcr-1*, obteniendo resultados esperanzadores y la posibilidad de probar este sistema con otros plásmidos relacionados con la resistencia bacteriana, así como la optimización de la técnica para aplicaciones terapéuticas (Dong et al., 2019).

ii) Inhibir el proceso de conjugación. Otra posible estrategia puede ser el ataque al T4SS o a las chaperonas necesarias para su formación. Se han encontrado ácidos grasos insaturados y 2-alquinoicos como inhibidores de la ATPasa asociada al complejo T4SS (Ripoll-Rozada et al., 2016). Un estudio más reciente ha demostrado como el ácido 2-hexadecinoico (2-HDA) ($C_{16}H_{28}O_2$) es capaz de inhibir la maquinaria de conjugación *in vivo* en agua y el intestino de modelos murinos, ambos reservorios donde se produce una gran transmisión de plásmidos con resistencia a antibióticos (Palencia-Gándara et al., 2021).

iii) Atacar a la bacteria donadora. Se han identificado una serie de mutaciones en genes no esenciales de la bacteria donadora capaces de reducir la frecuencia de conjugación (Alalam et al., 2018).

En resumen, el desarrollo de compuestos inhibidores de la conjugación, como adyuvante al uso de antibióticos, es una de las estrategias más prometedoras para frenar la diseminación de los plásmidos portadores de factores de virulencia y genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas (Graf et al., 2019).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La hipótesis que sustenta este trabajo se centra en cómo la adquisición de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia por parte de las cepas comensales de *E. coli* puede influir significativamente en la fisiología de la bacteria receptora. Entre los aspectos potencialmente afectados se incluyen la resistencia a antimicrobianos, la producción de hemolisina, la expresión de factores de virulencia y la motilidad.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo principal de este estudio es profundizar en el conocimiento de los mecanismos de conjugación bacteriana, involucrados en la adquisición de determinantes de resistencia y virulencia, a partir de aislamientos de *E. coli* de origen porcino, pertenecientes al clon ST131 clado B, multirresistentes (MDR) y resistentes a la colistina (MCR). Asimismo, se busca analizar el impacto que la incorporación de determinados plásmidos puede tener sobre la fisiología de las cepas comensales receptoras (transconjugantes).

Objetivos específicos

- Seleccionar cepas donadoras portadoras de resistencia a ampicilina y sensibilidad al cloranfenicol, a partir de aislamientos de *E. coli* de origen porcino pertenecientes al clon ST131 clado B.
- Estudiar, tanto genotípica como fenotípicamente, la capacidad de transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia hacia las cepas comensales.
- Caracterizar los plásmidos responsables de la transferencia de factores de virulencia y resistencia en las cepas transconjugantes.
- Evaluar fenotípicamente el impacto de la adquisición de dichos factores, mediante conjugación bacteriana, sobre la fisiología de las cepas transconjugantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron: agar triptona de soja (TSA; AppliChem-PanReac), caldo triptona de soja (TSB; AppliChem-PanReac), agar MacConkey Lactosa (ML; Oxoid), agar Mueller-Hinton (MH; Oxoid), solución Ringer (Scharlau), caldo Luria (LB; Miller's LB Broth; Condalab), agar LB (Lennox; Condalab), medio MIL (*Motility Indole Lysine Medium*; BD Difco™), medio agar sangre comercial, medio mínimo sales M9 con glucosa (MM), medio mínimo sales M9 con glucosa y agar.

De los medios empleados: TSA, TSB, agar ML, agar MH, solución Ringer, LB, agar LB, y medio MIL fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante, que consistían en disolver la cantidad indicada de medio en el volumen de agua destilada deseado. Los medios sólidos fueron dispensados en placas de Petri estériles en cabina tras ser autoclavados, mientras que los medios líquidos se mantuvieron en la botella o tubos donde se autoclavaron hasta el momento de su utilización. Con excepción del medio MIL, un medio semisólido, que se dispuso en tubos en forma de U y posteriormente fue autoclavado. El medio agar sangre se compró ya preparado en placas Petri. Todos los medios se conservaron en la cámara fría a 4 °C.

Preparación de medios con antibióticos

Para determinados protocolos fue necesario añadir al medio antibióticos. Los antibióticos utilizados fueron: ampicilina, cloranfenicol y kanamicina a 100 µg/mL, 20 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente.

Se pesó la cantidad de antibiótico necesaria para obtener la concentración deseada. A continuación, en el caso de la ampicilina y la kanamicina se disolvieron en el volumen específico de agua destilada y se filtraron posteriormente. Por otro lado, el cloranfenicol se disuelve en etanol, por lo que no es necesario filtrarlo.

Estos antibióticos se añaden en cabina a los medios ya autoclavados para conservar la esterilidad. Es importante que los medios se encuentren a menos de 50 °C a la hora de añadir los antibióticos o estos se degradarían.

Preparación medio mínimo sales M9 con glucosa

El medio mínimo con glucosa, para 100 mL de volumen total, está compuesto por: 20 mL de sales M9 5X (preparada disolviendo 64 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g de KH_2PO_4 , 2,5 g de NaCl en un litro de agua destilada), 2 mL de glucosa (20%), 200 µL de MgSO_4 (1 M), 10 µL de CaCl_2 (1 M), 50 µL de tiamina (0,5%) y 79 mL de agua destilada.

Para garantizar la esterilidad, las sales M9 5X, la solución CaCl_2 , la solución MgSO_4 y el agua destilada se autoclavan; mientras que, la solución de tiamina (0,5%) y la solución de glucosa (20%) se filtran en cabina.

En el caso del medio mínimo sólido, los componentes y el procedimiento son los mismos con excepción de que a los 79 mL de agua destilada se le añade 1,5 g de agar (*American Bacteriological Agar*; Condalab).

En ambos casos, todos los componentes se mezclan en campana a una botella estéril y en el caso del medio con agar se dispensa en placas Petri estériles.

Origen de las cepas

En este trabajo se ha estudiado una colección de 11 cepas de origen porcino de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 clado B, con perfiles de resistencia MDR (Del inglés, *Multidrug-Resistant*) y MCR (Del inglés, *Mobilized Colistin Resistance*). Siete de las cepas fueron aisladas de heces de lechones con diarrea entre los años 2006 y 2016, y las cuatro restantes, de carne de canales de cerdo contaminada entre 2011 y 2012 (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020).

La caracterización presuntiva de las cepas como ExPEC, APEC y UPEC fue realizada por PCR mediante la detección de genes marcadores de cada patotipo (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). Estas cepas, utilizadas como cepas donadoras en los estudios de conjugación, proceden del Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli* (LREC) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Por otro lado, las cepas receptoras fueron la MG1655, una cepa comensal modelo de *E. coli* (Guyer et al., 1981) y la AAG1, una MG1655 Δ lac fliC (Åberg et al., 2008), ambas cedidas para este trabajo por el grupo de investigación de Biología molecular de bacterias patógenas y estrategias antimicrobianas de la Universidad de Barcelona.

Conservación de las cepas de *Escherichia coli*

Todas las cepas estudiadas, así como otras utilizadas en este trabajo, se conservaron en tubos Vancutainer™ con medio de conservación. En función del tipo de cepa se conservó en diferentes condiciones.

Las potenciales cepas donadoras (LREC_153, LREC_154, LREC_155, LREC_157, LREC_158, LREC_159, LREC_160, LREC_161, LREC_162, LREC_168 y LREC_176) y las cepas receptoras (AAG1 y MG1655) se conservaron en medio de conservación inespecífico estéril compuesto por 11,5 g/L de Agar nutritivo (Applichem -Panreac) y 4 g/L de Caldo nutritivo (Applichem -Panreac). Las cepas transconjugantes derivadas de AAG1 y MG1655 se conservaron en el mismo medio, suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL) en el caso de los transconjugantes AAG1, y únicamente con ampicilina (100 µg/mL) en el caso de los transconjugantes MG1655. Todas estas muestras se conservan a temperatura ambiente.

Además, para una mayor seguridad también se realizó una copia de congelación de las cepas incluidas en este trabajo, así como de los transconjugantes obtenidos. Para la preparación de dicha copia se mezcló en un criovial partes iguales de un cultivo de bacterias en TSB y glicerol 20%, que se llevó al congelador a -20 °C. En el caso de las transconjugantes este medio de congelación se suplemento con ampicilina (100 µg/mL).

Caracterización fenotípica de las cepas donadoras y receptoras

Obtención de cultivos puros

A partir de los tubos con medio de conservación se realiza una siembra por agotamiento de estrías en un medio general TSA y un medio selectivo diferencial agar ML, con el objetivo de obtener colonias aisladas y confirmar la ausencia de contaminaciones. Además, el medio agar ML, específico de gramnegativas, permitió la caracterización del fenotipo lac (positivo o negativo), mediante un viraje de color debido a un indicador de pH incluido en el medio que responde a la capacidad de la bacteria de consumir la lactosa disponible. También se caracterizó a las colonias bacterianas en función de si presentaban textura lisa o rugosa y morfología redonda o estrellada.

Caracterización del perfil de resistencia

Tras el reaislamiento, fue necesario confirmar las resistencias a antibióticos de las cepas incluidas en este trabajo, con el fin de hacer una correcta selección de las cepas donadoras, así como confirmar que las cepas receptoras poseían las características esperadas. Por tanto, se realizó un antibiograma mediante la técnica de difusión de discos en agar según la técnica descrita por Barry & Thornsberry (Barry et al., 1980) con leves modificaciones. Las cepas a las que se le realizó el antibiograma fueron: las cepas potencialmente donadoras (LREC_153, LREC_154, LREC_155, LREC_157, LREC_158, LREC_159, LREC_160, LREC_161, LREC_162, LREC_168 y LREC_176) y las receptoras (AAG1 y MG1655).

A partir de un cultivo fresco se selecciona una colonia aislada y se inocula con ayuda de un asa de siembra estéril un tubo con 5 mL de TSB. La concentración bacteriana se ajustó a un valor de 0,5 en la escala de McFarland (aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Con un hisopo estéril empapado de la suspensión bacteriana, se siembra mediante la técnica de siembra en césped una placa de Mueller-Hinton (4 mm de grosor/pH 7,2-7,4, se distribuyeron 20 mL por placa). Transcurridos 5 minutos desde la siembra, se colocan los discos de antibiótico en la placa, dejando un espacio de al menos 2,5 cm entre cada disco. Tras dejar difundir el antibiótico a temperatura ambiente otros 5 minutos, se llevan las placas a incubar a 37 °C durante 18-24 horas. Pasado este tiempo se mide el diámetro de los halos de inhibición generados alrededor de cada disco.

La interpretación de los resultados para determinar si una cepa es resistente (R), intermedio (I) o sensible (S) se basó en los criterios de 2025 de CLSI (del inglés, *Clinical and Laboratory Standards Institute*) y EUCAST (del inglés, *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Se analizaron antimicrobianos de las siguientes clases: penicilinas (ampicilina); combinaciones de penicilina con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico); cefalosporinas de 1º (cefazolina), 2º (cefuroxima y cefoxitina) y 3º generación (ceftazidima y ceftriaxona); monobactámicos (aztreonam); carbapenémicos (imipenem); sulfonamidas (cotrimoxazol); tetraciclinas (doxiciclina y tetraciclina); fenicoles (cloranfenicol); fluoroquinolonas (ácido nalidíxico y ciprofloxacina) y aminoglucósidos (amikacina y

gentamicina). Además, también se analizó la kanamicina (aminoglucósido) mediante siembra en una placa de TSA suplementada con este antimicrobiano en una concentración de 25 µg/mL, siendo resistentes las cepas capaces de crecer en este medio.

Determinación de los fenotipos BLEE y AmpC

Así mismo, para identificar si alguna de las cepas donadoras es productora de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), se realizó la prueba de sinergia de doble disco y la prueba de discos combinados con inhibidor (Drieux et al., 2008). Estas pruebas también indican la posibilidad que la bacteria sea productora de β-lactamasas de tipo AmpC.

El protocolo para las pruebas de sinergia es el mismo que para los antibiogramas, con la excepción de que, en este caso, los discos de antibiótico deben estar colocados de una manera específica.

Para la prueba de doble disco (DDST), se coloca un disco de amoxicilina clavulánico (AMC 30) con una concentración de 20 µg y 10 µg respectivamente, en el centro de la placa. Rodeando este disco y separados 33 mm del centro se colocan discos de cefotaxima (CTX 30), ceftazidima (CAZ 30), aztreonam (ATM 30) y cefepima (FEP 30). Cada disco tiene una carga estándar de 30 µg (Ilustración 2). La prueba DDST se interpreta de manera que se obtendrá un resultado positivo, es decir, se considerará una cepa BLEE si el halo de inhibición de los discos colocados alrededor del disco de amoxicilina-clavulánico se amplifica en una forma característica de “cerradura” o “corcho de champagne”. Además, si presenta resistencia al ácido clavulánico y sensibilidad a la cefepima, podría ser potencialmente una AmpC.

Para la prueba de discos combinados con inhibidor, se coloca un disco de cefoxitina (FOX30) en el centro de la placa. Rodeando este disco se disponen discos de cefotaxima (CTX 30) y ceftazidima (CAZ 30) con una concentración de 30 µg. Además de estos mismos discos con ácido clavulánico (CLA) en una proporción 20 µg /10 µg (Ilustración 3). En este caso, un resultado se considera positivo para BLEE si el diámetro de los antibióticos con clavulánico es 5 mm mayor que el de los antibióticos sin clavulánico. Además, si la cepa presenta resistencia a la cefoxitina, podría indicar la presencia de enzimas tipo AmpC.

Ilustración 2. Prueba de doble disco de la cepa LREC_161.



AMC30 (amoxicilina-clavulánico), **CTX30** (cefotaxima), **ATM30** (aztreonam), **FEP30** (cefepima) y **CAZ30** (ceftazidima)

Ilustración 3. Prueba de discos combinados con inhibidor de la cepa LREC_161.



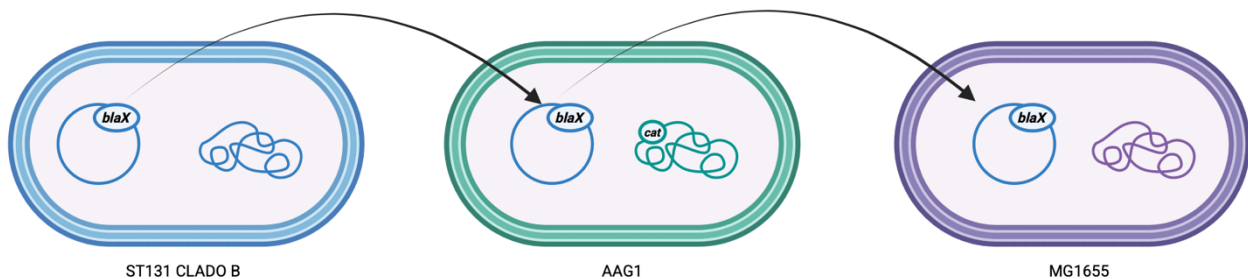
FOX30 (cefoxitina), **CTX30** (cefotaxima), **CTX+CLA** (cefotaxima-clavulánico), **CAZ+CLA** (ceftazidima-clavulánico) y **CAZ30** (ceftazidima)

Ensayos de conjugación

Se llevaron a cabo dos rondas secuenciales de conjugación como se muestra en la ilustración 4. En la primera conjugación el plásmido se transfirió desde una cepa donadora (LREC ST131 porcinas) a la cepa receptora AAG1. Esta cepa es una mutante MG1655 Δ lac fliC, de manera que, se ha modificado para que carezca de capacidad de metabolizar lactosa (lac-) y de movilidad, además presenta resistencia al cloranfenicol, aunque es sensible al resto de antibióticos.

A continuación, se llevó a cabo una segunda conjugación, donde las cepas transconjugantes obtenidas con anterioridad pasaron a ser las nuevas cepas donadoras y la cepa receptora fue la MG1655, una cepa modelo comensal *E. coli* K-12, lactosa positiva y que no presenta resistencia a antibióticos.

Ilustración 4. Esquema resumen de las dos conjugaciones bacterianas. Creada con BioRender.com



Las cepas LREC ST131 clado B portan potencialmente un plásmido que vehiculiza el gen de resistencia a ampicilina (*blaX*). De manera que, si la transferencia del plásmido mediante conjugación con la cepa receptora AAG1 es exitosa, se originarán transconjugantes que portan tanto el gen de resistencia a ampicilina como el gen de resistencia cromosómica al cloranfenicol (*cat*). Por último, la segunda conjugación consiste en transmitir ese mismo plásmido que aporta resistencia a la ampicilina desde las transconjugantes AAG1 a una nueva cepa receptora, la MG1655.

Primera conjugación

Para la primera conjugación como se ve en la ilustración 5, a partir de un cultivo fresco, se inoculan tubos de centrifuga de 50 mL (Falcon) con 3 mL de LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) para las potenciales cepas donadoras y LB suplementado con cloranfenicol (20 μ g/mL) para las cepas receptoras, cultivos que se dejan crecer toda la noche. Al día siguiente se centrifugan los tubos a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos, una vez pasado este tiempo se deshecha el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en LB sin antibióticos.

A continuación, se añaden en un microtubo de 1,5 ml (Eppendorf), 350 μ L de la cepa receptora y 150 μ L de la cepa donadora, que se deja incubar a 37 °C durante 4 horas. Tanto en este primer ensayo de conjugación, como en el resto que se explicaran más adelante se incluyeron sistemáticamente controles negativos. Tanto para la cepa receptora (350 μ L suspensión bacteriana receptora y 150 μ L de LB), como la cepa donadora (350 μ L LB y 150 μ L de suspensión bacteriana donadora).

En los casos en los que se haya dado la conjugación, las cepas transconjugantes podrán crecer en medio con cloranfenicol y ampicilina (la resistencia a ampicilina es aportada por el plásmido transferido). Sin embargo,

las cepas donadoras y las receptoras que no han adquirido ningún plásmido no podrán crecer pues son sensibles al cloranfenicol y a la ampicilina, respectivamente. Una limitación de este protocolo es el hecho de que se podría haber transferido un plásmido que no aportará resistencia a la ampicilina, sin embargo, si no se pasa un plásmido portador de dicha resistencia no se podrá ver esta conjugación.

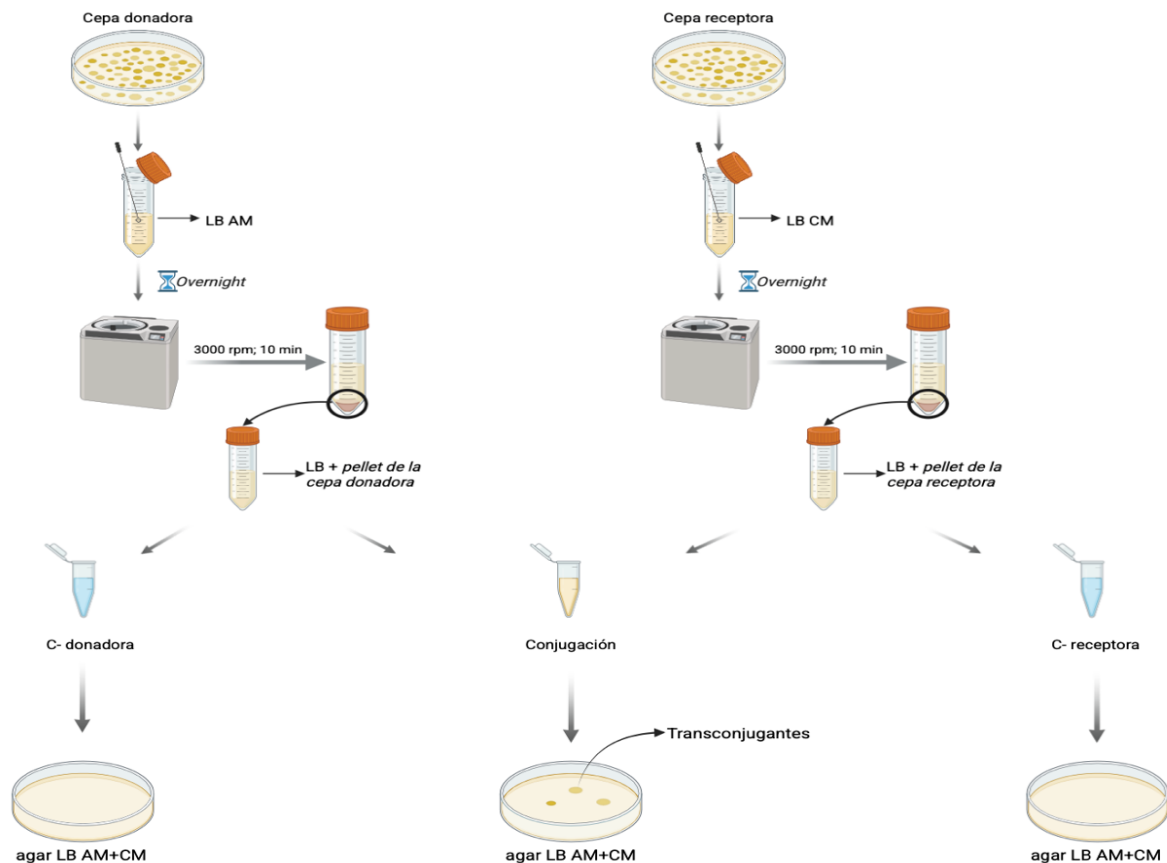
Por tanto, una vez transcurridas las 4 horas de incubación, a partir del microtubo donde potencialmente ha ocurrido la conjugación se llevan a cabo dos diluciones seriadas 1:10 y 1:100 en solución Ringer. Se añaden 100 µl tanto de la suspensión madre como de las diluciones en una placa de agar LB suplementada con cloranfenicol (20 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml), que se extenderá de forma homogénea por toda la placa con ayuda de perlas de vidrio autoclavadas. Este cultivo se dejará creciendo 24 horas a 37 °C. Aquellas placas en las que haya crecimiento serán en las que se ha producido la conjugación. Los controles negativos se siembran usando el mismo procedimiento.

Pasadas las 24 horas, se seleccionaron las cepas transconjugantes, es decir, aquellas que crecieron en las condiciones selectivas. Para garantizar la correcta transferencia, se siembra una colonia aislada de las supuestas transconjugantes en agar MacConkey Lactosa suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL), siendo este un doble marcador. Por un lado, ni las cepas donadoras ni las receptoras pueden crecer en un medio con ambos antibióticos, solamente las transconjugantes. Además, el fenotipo lac de la cepa donadora (lac+) y receptora (lac-) es distinto, por tanto, para considerar a los transconjugantes validos deberán ser lactosa negativas, al igual que la cepa receptora. Se dieron dos pases en agar ML para confirmar que se obtuvieron cultivos puros estables de los transconjugantes.

En conclusión, la resistencia a los antibióticos, así como el fenotipo lac actuaron como marcadores confirmando la adquisición del plásmido por la cepa receptora. Finalmente, se conservan las nuevas cepas transconjugantes en medio de conservación y medio de congelación.

Las cepas donadoras adecuadas para el primer protocolo de conjugación necesitaban cumplir los requisitos: ser sensibles a cloranfenicol, resistentes a ampicilina y lactosa positivas. Estos datos se obtuvieron en la caracterización fenotípica de las cepas donadoras, de manera que, de las 11 potenciales cepas donadoras se han descartado 2 (LREC_161 y LREC_176) por no cumplir estos requisitos. Por tanto, se seleccionaron 9 cepas donadoras para el ensayo.

Ilustración 5. Esquema del protocolo de la primera conjugación. Creada con BioRender.com



LB AM, caldo LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **LB CM**, caldo LB suplementado con cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **LB**, caldo LB; **agar LB AM+CM**, agar LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **rpm**, revoluciones por minuto; **overnight**, las bacterias han crecido durante toda la noche; **C-**, control negativo.

En este protocolo de primera conjugación, las cepas donadoras son las ST131 porcinas, mientras que la cepa receptora es la AAG1. En esta imagen no figuran las diluciones seriadas 1:10 y 1:100 que se hicieron a partir del microtubo donde tiene lugar la conjugación en solución Ringer, que se sembraron también en placas de agar LB AM+CM con la misma técnica.

Segunda conjugación

La segunda conjugación se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la primera, con la diferencia de que, en este caso, las cepas donadoras fueron los transconjugantes obtenidos previamente, mientras que la cepa receptora fue la MG1655. Las condiciones en las que crecieron las cepas durante la noche fueron: las cepas donadoras en caldo LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y la cepa receptora en caldo LB sin antibióticos.

El objetivo, es que el plásmido que confiere resistencia a la ampicilina pase de las cepas transconjugantes a la MG1655, obteniendo así nuevas transconjugantes en una cepa no-mutante representativa de cepas comensales de *E. coli*. Pasado el periodo de conjugación de 4 horas, la mezcla se sembró del mismo modo que en la primera conjugación, pero utilizando placas de agar MacConkey Lactosa suplementadas con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tanto las cepas receptoras como las donadoras son resistentes a la ampicilina, por tanto, ambas crecerán en estas placas; sin embargo, difieren en su fenotipo lac, lo que permite distinguir las nuevas cepas

transconjugantes. Las colonias transconjugantes fueron aquellas con capacidad de crecer en presencia de ampicilina y con fenotipo lactosa positivas, representativo de la cepa MG1655.

De cada placa, se seleccionó una colonia aislada con fenotipo lac⁺ (transconjugante), que fue resembrada (en agar MacConkey Lactosa con ampicilina) para confirmar su perfil fenotípico. Por último, las cepas confirmadas como transconjugantes fueron conservadas tanto en medio de conservación como de congelación.

Curvas de crecimiento y optimización de la conjugación

Curvas de crecimiento

Con el objetivo de determinar el patrón de crecimiento en condiciones controladas de las cepas *E. coli* ST131 clado B porcinas incluidas en este trabajo, se realizó la curva de crecimiento de 1 de las 11 cepas donadoras seleccionada aleatoriamente (LREC_158) siguiendo el siguiente protocolo:

- En un matraz Erlenmeyer con 20 mL de LB estéril se inoculan 100 µL de una suspensión bacteriana previamente cultivada durante 24 horas en caldo LB. El matraz inoculado se llevó a un incubador orbital a 37 °C.
- Cada hora a partir de la segunda, durante un periodo de 8 horas tras la inoculación en caldo LB, se extraen 1000 µL del cultivo en una cabina de flujo, con ayuda de una micropipeta. Las muestras se añaden a un microtubo.
- De cada alícuota, 100 µL se emplearon para hacer diluciones seriadas en solución Ringer estéril. Se llevaron a cabo 10 diluciones seriadas 1:10, de manera que, las diluciones van de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰. Se sembraron 100 µL de la solución madre y de cada dilución en placas de agar LB con ayuda de perlas de vidrio estériles para garantizar un reparto homogéneo en toda la superficie. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, tras lo cual se realizó el recuento de colonias, permitiendo calcular las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro correspondientes hasta completar las 8 horas.
- Finalmente, para analizar los resultados se elaboró una gráfica donde figura en el eje X el tiempo transcurrido y en el eje Y el logaritmo de las UFC/mL.

Frecuencia de conjugación

Para estudiar las condiciones más óptimas de conjugación de las bacterias se analizó la frecuencia de conjugación en diferentes condiciones fisiológicas y de cultivo, como se puede ver en la ilustración 6. Para ello, se seleccionaron momentos específicos del crecimiento bacteriano y se emplearon medios de cultivo diferentes en los distintos ensayos de conjugación.

En concreto, se comparó la frecuencia de conjugación de las cepas que habían conjugado previamente (LREC_153 y LREC_154) en medio LB y medio mínimo sales M9 con glucosa dentro de una misma fase de crecimiento (fase exponencial o fase estacionaria) conocida gracias al protocolo anterior. También se compararon las frecuencias de conjugación entre ambas fases dentro de un mismo medio. De este modo, se

consigue el objetivo de analizar la conjugación bacteriana en distintas condiciones y determinar las más óptimas.

Para ello, se inocularon 100 μL de cultivo bacteriano —crecido *overnight* en caldo LB para la cepa receptora y caldo LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la cepa donadora— en un matraz Erlenmeyer con 20 mL de caldo LB, que se incubó en un incubador orbital a 37 °C.

Tras 5 horas de incubación, los cultivos bacterianos entraron en fase exponencial. En ese momento, se transfirieron 3 mL de cada crecimiento bacteriano en dos tubos Falcon, que se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se utilizaron dos tubos Falcon para la cepa receptora y otros dos para la donadora.

Una vez finalizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se mantuvo el *pellet*. Cada uno de los *pellets* correspondientes a una misma cepa se resuspendieron en 3 mL de medio nuevo: uno en caldo LB y otro en caldo medio mínimo M9 con glucosa. De esta manera, se consiguen preparaciones de la cepa donadora y receptora en ambos medios, permitiendo cumplir el objetivo de comparar la frecuencia de conjugación en diferentes medios con el resto de las condiciones equivalentes.

A continuación, se prepararon las mezclas para la conjugación en medio LB: en un Eppendorf se dispensaron 350 μL de la cepa receptora (previamente resuspendida en LB) y 150 μL de la cepa donadora (también en LB), y se dejó incubar durante 3 horas a 37 °C para permitir la conjugación. Así mismo, se prepararon los controles negativos: un Eppendorf con 150 μL de la donadora y 350 μL de LB, y otro con 350 μL de la receptora y 150 μL de LB.

De forma paralela, se repitió exactamente el mismo procedimiento utilizando los cultivos resuspendidos en medio mínimo, es decir, se mezclaron 350 μL de la cepa receptora en medio mínimo con 150 μL de la cepa donadora en el mismo medio. Igualmente, se prepararon los controles negativos correspondientes, sustituyendo el LB por medio mínimo en todas las mezclas. Estas preparaciones también se incubaron durante 3 horas a 37 °C para permitir la conjugación en condiciones equivalentes.

Pasadas las 3 horas, se realizaron 10 diluciones seriadas 1:10 en solución Ringer a partir del Eppendorf donde tuvo lugar la conjugación en medio LB, obteniéndose un total de 11 tubos (desde la muestra original hasta la dilución 10^{-10}). Estas mismas diluciones se realizaron en paralelo para el Eppendorf correspondiente a la conjugación en medio mínimo.

En placas de agar LB y agar medio mínimo, ambos suplementados con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se sembraron 100 μL de la muestra donde tuvo lugar la conjugación y de las dos primeras diluciones, utilizando perlas de vidrio para una distribución homogénea de las muestras en la placa. Asimismo, se sembraron 100 μL de todas las diluciones en placas de agar LB y en placas de agar medio mínimo suplementadas con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En todos los casos siempre se mantuvo la correspondencia entre el tipo de medio líquido utilizado en la conjugación y el medio sólido en el que se sembró, de manera que, las

muestras en LB se sembraron en agar LB y las muestras en medio mínimo se sembraron en agar medio mínimo, garantizando la coherencia experimental.

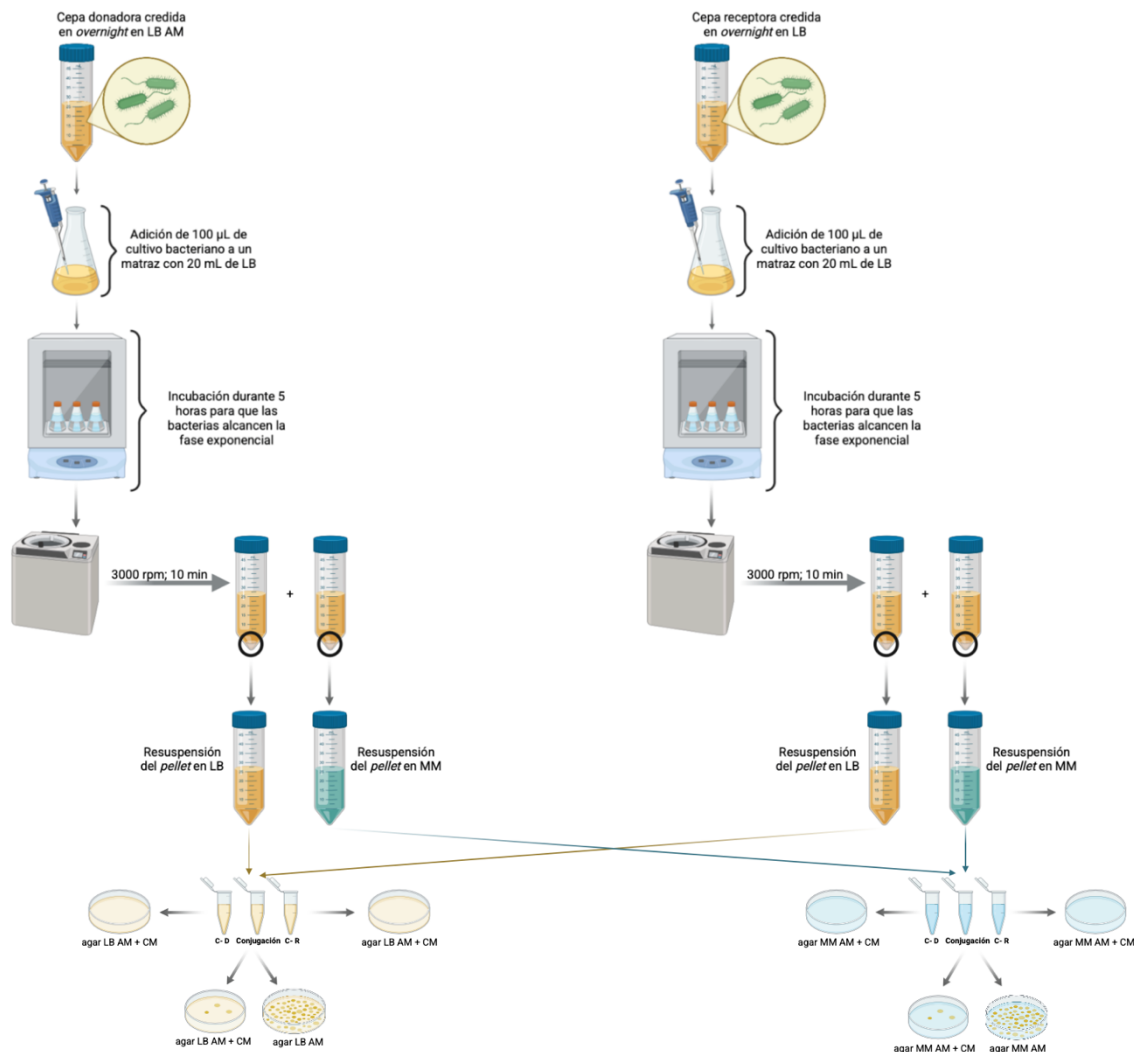
La siembra en placas con solo ampicilina permite cuantificar tanto las cepas donadoras como las transconjugantes, ya que ambas presentan resistencia a este antibiótico. Por el contrario, la siembra en medios con ampicilina y cloranfenicol selecciona únicamente a las transconjugantes, que han adquirido por conjugación el plásmido con el gen de resistencia a la ampicilina. Esta estrategia permite determinar la frecuencia de conjugación calculando la proporción de transconjugantes respecto al total de bacterias con resistencia a ampicilina, es decir, permite identificar el porcentaje de bacterias capaces de transmitir el plásmido:

$$\text{Frecuencia de conjugación} = \frac{\text{UFC transconjugantes}}{\text{UFC transconjugantes} + \text{donadoras}} \times 100\%$$

Este mismo protocolo se repite a las 7 horas, momento en el que los crecimientos bacterianos se encuentra en fase estacionaria.

Además, también se siembran 100 μL de los controles negativos en placas con ampicilina y cloranfenicol.

Ilustración 6. Resumen esquemático del protocolo empleado para determinar la frecuencia de conjugación en diferentes condiciones. Creada con BioRender.com



LB AM, caldo LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL); **LB**, caldo LB; **agar LB AM**, agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), **agar LB AM+CM**, agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL); **MM**, medio mínimo sales M9 con glucosa; **agar MM AM**, agar medio mínimo sales M9 con glucosa suplementado con ampicilina (100 µg/mL); **agar MM AM+CM**, agar medio mínimo sales M9 con glucosa suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL); **rpm**, revoluciones por minuto; **overnight**, las bacterias han crecido durante toda la noche; **C- D**, control negativo de la cepa donadora; **C- R**, control negativo de la cepa receptora.

La imagen muestra un resumen del protocolo para determinar la frecuencia de conjugación a las 5 horas, es decir, cuando las bacterias se encuentran en fase exponencial. Después de haber pasado 5 horas, se han extraído del matraz Erlenmeyer 3 mL de crecimiento bacteriano y se han centrifugado, tal y como se muestra en la figura. Después, aunque no se muestra en la figura, el matraz fue devuelto al incubador orbital para que las bacterias continúen creciendo hasta las 7 horas, donde alcanzan la fase meseta y se repitió el protocolo.

En esta imagen no figuran las diluciones seriadas 1:10 y 1:100 que se hicieron a partir del microtubo donde tiene lugar la conjugación —tanto en medio mínimo como LB— en solución Ringer y se sembraron en placas de LB y MM, respectivamente, en ambos casos suplementadas con AM y CM. Así como tampoco figuran las diluciones seriadas que se hicieron a partir de esa misma dilución madre de 10^{-1} a 10^{-10} y se sembraron en placas LB y MM suplementadas con AM.

Caracterización fenotípica de las cepas transconjugantes

Siembra en agar MacConkey Lactosa

Las cepas transconjugantes AAG1 y MG1655 se sembraron en agar MacConkey Lactosa para confirmar tanto que son gramnegativas como su capacidad para fermentar lactosa.

Antibiogramas

Se realizó el antibiograma de las cepas transconjugantes, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Movilidad

En primer lugar, las cepas se sembraron en medio semisólido MIL dispensado en tubos en U y se dejaron incubando 24 horas. Se repitió este proceso 2 veces más, dando pases en las bacterias no móviles del lado donde se había sembrado y de las móviles del contrario con el objetivo de inducir la expresión del fenotipo móvil. Este protocolo se llevó a cabo con las cepas donadoras LREC capaces de llevar a cabo la conjugación, las cepas receptoras (AAG1 y MG1655) y las transconjugantes. Se consideró que una cepa era móvil cuando se observó turbidez en el brazo del tubo en U que no se había inoculado.

Hemólisis

A partir de un cultivo fresco se llevó a cabo una siembra en placas de medio agar sangre comercial y se vieron los resultados a las 24 y 48 horas, para determinar si la bacteria era α - o β -hemolítica o si no poseía la capacidad de romper los glóbulos rojos. Este estudio fenotípico se llevó a cabo con las mismas cepas que el estudio de la movilidad.

Caracterización molecular

Protocolo general de PCR

El primer paso es la extracción de ADN bacteriano. Para ello se resuspendió una pequeña cantidad del cultivo bacteriano al que se desea extraer en ADN en 600 μ L de agua Milli-Q estéril en un Eppendorf, que posteriormente se introdujo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 11.000 rpm durante 2 minutos, obteniéndose el ADN en el sobrenadante y quedando los residuos celulares en el *pellet*. Esta extracción se hizo para todas las cepas donadoras y receptoras, transconjugantes de la 1^o conjugación, transconjugantes de la 2^o conjugación y cepas control positivas del LREC. Estos extractos de ADN pueden congelarse para usarse en reacciones de PCR posteriores.

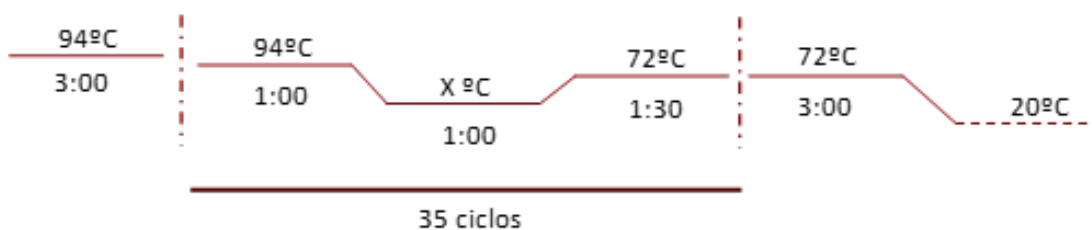
La mezcla de reacción incluye: la mezcla con los dNTPs y Taq polimerasa (NZYtechTaq 2x Green Master Mix), *primers*, agua Milli-Q estéril y ADN molde. En cada pocillo de PCR se añadieron 12,5 μ L de NZYtechTaq 2x Green Master Mix, un volumen específico de *primers* en función del gen a amplificar, el volumen correspondiente de agua para completar hasta 20 μ L, y finalmente 5 μ L de ADN, sumando un

volumen total de 25 μL por reacción. Para cada mezcla se incluyeron sistemáticamente controles negativos y positivos.

Las muestras se llevaron a un termociclador, donde se les aplicó un programa con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos. A esta etapa le siguieron 35 ciclos de amplificación compuestos por una desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, una hibridación cuya temperatura varió en función del par de *primers* utilizados y se mantuvo durante 1 minuto y una extensión (polimerización) a 72 °C durante 1 minuto y medio. Por último, se realizó una extensión final (polimerización final) a 72 °C durante 3 minutos. Finalizado el proceso, las muestras, ahora amplificadas, se mantienen a 20 °C hasta su posterior análisis mediante electroforesis (Ilustración 7).

La lectura de los resultados se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa convencional bajo luz UV. El gel donde se cargan los amplificados consiste en un gel de agarosa al 1,5%, en tampón TAE 1x (1,6 M Tris; 0,8 M acetato sódico; 0,025 M EDTA) al que se le añaden 3 μL de *Green Safe Premium* (Nzytech) por cada 100 mL de TAE. Se considerará un resultado positivo cuando este muestre una banda a la misma altura y con la misma intensidad que el control positivo.

Ilustración 7. Esquema del programa de PCR utilizado.



Programa empleado para la amplificación de los genes por PCR constituidos por una desnaturalización inicial (94 °C, 3 min) seguida de 35 ciclos de destaturalización (94 °C, 1 min), anillamiento (X °C en función de los cebadores, 1 min) y polimerización (72 °C, 1,5 min). Pasados los 35 ciclos, se produce una polimerización final (72 °C, 3 min) y las muestras se mantienen a 20 °C hasta su recogida.

Preparación de los *primers*

Para preparar los *primers* a una concentración final de 100 μM (stock de almacenamiento), se tomó como referencia la cantidad de nmoles indicada por el proveedor, la cual figuraba en el "Certificado de análisis" o en la etiqueta del tubo correspondiente. La hidratación se realizó utilizando un tampón de reconstitución compuesto por Tris-HCl 1 mM y EDTA 0,01 mM, ajustado a pH 8. El volumen de tampón añadido varió en función de los nmoles del *primer* y se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{L de tampón a añadir} = \frac{\text{nmoles}}{100 \mu\text{M}} \times 1000$$

A continuación, a partir del stock de almacenamiento, se tomó la cantidad necesaria de *primer* para preparar, en Eppendorfs, una alícuota de trabajo a una concentración 10 μM empleando el tampón de reconstitución para alcanzar un volumen final de 500 μL .

Tanto el stock de almacenamiento como el de trabajo fueron homogeneizados tras la adición del tampón. Una vez preparadas ambas alícuotas se congelaron hasta su uso.

Puesta a punto PCR

Para un correcto anillamiento de los *primers* y, por tanto, una correcta amplificación de las muestras, son fundamentales unas correctas condiciones de temperatura de anillamiento y concentración de *primers*. En algunos de los genes analizados ya se conocían las condiciones óptimas, pero en otros casos fue necesario ajustar la reacción de PCR. Para poner a punto las PCR se usó un volumen de *primer* estándar de 1 µL por pocillo de PCR y las muestras se sometieron a un gradiente de temperaturas de anillamiento: 45, 50, 55, 60, 65 y 70 °C. Esta estrategia permitió identificar la temperatura óptima para evitar amplificaciones inespecíficas, así como determinar si era necesario un ajuste de la concentración de los *primers*. Los genes que se pusieron a punto se encuentran indicados en el anexo II.

Caracterización molecular de las cepas

En primer lugar, se realizó, para todas las cepas potencialmente donadoras, la detección por PCR de los marcadores genéticos que permiten designar presuntivamente a una cepa como perteneciente a los patotipos ExPEC; APEC y UPEC (Anexo I, Tabla 9).

Para que una cepa de *E. coli* sea considerada presuntivamente como ExPEC, debe portar dos o más de los siguientes marcadores genéticos: *papEF* y/o *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *iutA* y *kpsM II*. Por otro lado, para que una cepa sea designada UPEC debe portar al menos tres de estos cuatro genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* y *yfcV* (J. R. Johnson et al., 2015).

Por último, para la clasificación APEC, la cepa debe contener al menos cuatro de los siguientes marcadores: *hlyF*, *iutA*, *iroN*, *iss* y *ompT* (T. J. Johnson et al., 2008).

En segundo lugar, para identificar los genes que se transfirieron a los transconjugantes se llevó a cabo la detección por PCR de genes pertenecientes a distintas categorías (Anexo II, Tabla 10): i) tipado de relaxasas o MOB, ii) tipado del grupo de incompatibilidad o Inc, iii) genes de resistencia a antibióticos y iv) factores de virulencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de cepas donadoras y receptoras

Antes de comenzar los estudios de frecuencia de conjugación y transferencia horizontal de material genético, se realizó la caracterización molecular y fenotípica del perfil de virulencia y resistencia de las cepas donadoras y receptoras incluidas en este trabajo.

Caracterización fenotípica

Las características morfológicas de las colonias aisladas en ML se muestran en la tabla 1. Todas las cepas son gramnegativas, lo cual tiene sentido pues pertenecen a la especie *E. coli*. Además, todas las cepas, con excepción de AAG1, poseen la capacidad de fermentar lactosa para obtener energía, es decir, poseen el operón *lac*. Todas las cepas patógenas ST131 (potenciales cepas donadoras) son capaces de utilizar la lactosa como fuente de energía, lo cual tiene sentido pues una estrategia común en estas cepas es poseer mecanismos para aprovechar diferentes azúcares u otras fuentes de carbono para obtener energía, suponiendo una ventaja adaptativa para el patógeno (Leimbach et al., 2013).

La textura y el aspecto de las colonias fue variable, observándose dos morfologías: lisa y rugosa. Ocho de las 11 potenciales cepas donadoras y las dos cepas receptoras (AAG1 y MG1655) presentaron morfología lisa y redondeada, mientras que 3 cepas (LREC_155, LREC_160 y LREC_168) presentaron una textura rugosa y aspecto estrellado en las colonias aisladas. Llama la atención como a pesar de ser la misma especie se presentan morfologías diferentes, esto ya se ha observado en otros estudios (Wang et al., 2025), donde se aislaron dos cepas de *E. coli* de un mismo individuo con fenotipos totalmente diferentes, pero genéticamente similares. Lo que indica que los motivos moleculares para estas diferencias fenotípicas aún son desconocidas y se necesitaría una mayor investigación en el tema.

Tabla 1. Caracterización fenotípica de las potenciales cepas donadoras y de las cepas receptoras.

Cepa	Fenotipo		
	Gram	Lac	Morfología
LREC_153	-	+	Lisa- Redonda
LREC_154	-	+	Lisa- Redonda
LREC_155	-	+	Rugosa-Estellada
LREC_157	-	+	Lisa- Redonda
LREC_158	-	+	Lisa- Redonda
LREC_159	-	+	Lisa- Redonda
LREC_160	-	+	Rugosa-Estellada
LREC_161	-	+	Lisa- Redonda
LREC_162	-	+	Lisa- Redonda
LREC_168	-	+	Rugosa-Estellada
LREC_176	-	+	Lisa- Redonda

Tabla 1. Continuación.

Cepa	Fenotipo		
	Gram	Lac	Morfología
AAG1	-	-	Lisa- Redonda
MG1655	-	+	Lisa- Redonda

En la tabla se muestra el análisis fenotípico de las cepas donadoras y receptoras. Gram hace referencia a si las bacterias son gramnegativas y positivas, en este caso, todas son gramnegativas (-). Lac hace referencia a si las cepas son capaces de metabolizar la lactosa, en este caso todas son positivas (+) salvo la AAG1 (-). Finalmente, la textura indica la morfología de las colonias bacterianas que se clasificaron en lisas o rugosas y redondas o estrelladas.

Perfil de resistencia

Se analizaron los perfiles de resistencia de las 11 cepas donadoras empleando 17 antimicrobianos, bajo los criterios CLSI y EUCAST, además de un antimicrobiano más (kanamicina) por otro método, tal y como se describe en materiales y métodos. Los resultados fueron variados destacando que todas las cepas presentaban resistencia a la ampicilina, a excepción de una (cepa LREC_161), es decir, el 91% de las cepas eran resistentes a la ampicilina. El segundo antibiótico representante de grupo con mayor número de resistencias fue la tetraciclina, observándose que el 72% de las cepas eran resistentes. Además, un 64% de las cepas mostraron resistencia al ácido nalidíxico y un 36% a la cefazolina, gentamicina y amoxicilina clavulánico (Tabla 2). Por otro lado, en cuanto a las pruebas de sinergia, ninguna de las cepas mostró el efecto de sinergia por el efecto combinado de los antibióticos betalactámicos con un inhibidor de β -lactamasas, lo que descarta el fenotipo BLEE. Tampoco presentaron las características necesarias para ser consideradas potencialmente AmpC.

La cepa LREC_153 fue la cepa que mostró resistencia a un mayor número de antibióticos (8 de 18). Además, de las 11 cepas potencialmente donadoras, 7 pudieron clasificarse como multirresistentes (MDR) (LREC_153, LREC_157, LREC_158, LREC_159, LREC_160, LREC_168 y LREC_176) (Tabla 2), es decir, alrededor del 60% de las cepas estudiadas presentan resistencia a al menos 3 antibióticos de distintas familias (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). Este elevado porcentaje de cepas MDR pone en manifiesto la magnitud del problema que representa actualmente la diseminación de la resistencia a los antibióticos, la cual ha experimentado un aumento en los últimos años, en gran parte debido al uso inadecuado o excesivo de estos fármacos. No obstante, la aparición de resistencias es, en cierta medida, un proceso inevitable como resultado de la adaptación bacteriana y la presión de selección natural. Por ello, se hace imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra infecciones (Munita & Arias, 2016).

Por otro lado, las dos cepas receptoras son sensibles a todos los antibióticos testados, con la excepción de la cepa AAG1 que presentó resistencia al cloranfenicol, confirmando los fenotipos esperados (Tabla 2).

Tabla 2. Antibiograma de las cepas potencialmente donadoras y receptoras analizadas mediante EUCAST y CLSI.

CEPA	DISCO DE ANTIBIÓTICO												MDR ¹
	AM10	AMC30	CZ30	SXT25	D30	TE30	C30	NAL30	CIP5	AN30	GM10	KM ²	
LREC_153	R	R*	R	R	I	R	S	R	S	S	R	R	+
LREC_154	R	R	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	-
LREC_155	R	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-
LREC_157	R	R*	R	S	S	S	S	R	I	R	R	S	+
LREC_158	R	S	I	S	I	R	S	R	S*	R	R	R	+
LREC_159	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	S	R	+
LREC_160	R	R	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	+
LREC_161	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	-
LREC_162	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	-
LREC_168	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	+
LREC_176	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	+
AAG1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	X	-
MG1655	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	X	-

R, resistente; **S**, sensible; **I**, intermedio; **MDR**, multiresistente; **AM10**, ampicilina, **AMC30**, amoxicilina-clavulánico; **CZ30**, cefazolina; **SXT25**, cotrimoxazol; **D30**, doxiciclina; **TE30**, tetraciclina; **C30**, cloranfenicol; **NAL30**, ácido nalidixico; **CIP5**, ciprofloxacina; **AN30**, amikacina; **GM10**, gentamicina; **KM**, kanamicina.

Además de los antimicrobianos que figuran en la tabla, también se analizaron por el método de difusión de discos: cefuroxima (CXM30), ceftazidima (FOX30), ceftazidima (CAZ30), ceftriaxona (CRO30), aztreonam (ATM30) e imipenem (IMP10). Sin embargo, no se incluyeron en la tabla debido a que todas las cepas fueron sensibles.

Los antimicrobianos se encuentran ordenados por familias, de manera que, cada color hace referencia a una familia de antibióticos. ¹Se consideró a una cepa multiresistente (MDR) siempre que fuera resistente a al menos 3 antimicrobianos representantes de familias diferentes. Las cepas MDR positivas (+) fueron 7.

²La resistencia al antibiótico kanamicina (KM) no se llevó a cabo por el método de difusión de discos en agar, si no que las potenciales cepas donadoras se sembraron en TSA suplementado con kanamicina (25 µg/mL), de manera que, las cepas que crecieron se consideraron resistentes y las que no sensibles. **X** hace referencia a que ni la AAG1 ni MG1655 fueron analizadas para la resistencia a la kanamicina.

En la tabla figura un resumen conjunto de los datos analizados bajo los criterios EUCAST y CLSI. Si bien de manera general, ambos criterios coincidieron en los antimicrobianos, hubo algunos datos que no, son aquellos representados con *. En el caso de la amoxicilina-clavulánico, 2 de las 11 cepas (LREC_153 y LREC_157) son resistentes según el criterio EUCAST e intermedias según el criterio CLSI, por lo que se interpretan como resistentes. Por otro lado, la cepa LREC_158 es intermedia según CLSI y sensible según EUCAST, por lo que se interpretó como sensible.

Caracterización molecular de factores de virulencia

El 100% de las cepas ST131 clado B porcinas (donadoras) cumplieron con los criterios para ser clasificadas presuntivamente como ExPEC y 91% para UPEC (todas con excepción de LREC_176). Por otra parte, 8 (73%) de ellas poseen los genes de virulencia asociados a APEC (LREC_153, LREC_155, LREC_157, LREC_158, LREC_159, LREC_160, LREC_162 y LREC_168). Por tanto, estas cepas aisladas de diarreas en lechones y canales contaminados albergan un importante arsenal de factores de virulencia lo que las clasifica como potenciales patógenos extraintestinales (Tabla 3).

La presencia del clon ST131 en aislados animales, especialmente porcinos, es poco común, lo que ha llevado a una escasa representación de este tipo de cepas en la literatura científica (Reid et al., 2019). Este hecho hace especialmente importantes a estas cepas de origen porcino pertenecientes a este clon, pues permite evaluar el papel zoonótico de estas cepas patógenas y su capacidad de dispersión entre distintos nichos biológicos desde la perspectiva *One Health*.

Tabla 3. Determinación de estatus ExPEC, APEC y UPEC de las cepas donadoras por PCR.

Patotipo		Cepa										
Genes		LREC_1 53	LREC_1 54	LREC_1 55	LREC_1 57	LREC_1 58	LREC_1 59	LREC_1 60	LREC_1 61	LREC_1 62	LREC_1 68	LREC_1 76
ExPEC	<i>papC</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>papEF</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
	<i>sfa/focD</i> <i>E</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>afa/draB</i> <i>C</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>iutA</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	<i>kpsM II</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
UPEC	<i>vat</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>fyuA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>yfcV</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	<i>chuA</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
APEC	<i>ompT</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	<i>hlyF</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	<i>iutA</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	<i>iroN</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
	<i>iss</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
Resultados ¹		E, U y A	E y U	E, U y A	E, U y A	E, U y A	E, U y A	E, U y A	E y U	E, U y A	E, U y A	E

En la tabla se representan los genes asociados a cada patotipo, cada uno de ellos codifica para una característica que facilita o ayuda a la cepa patógena en la infección.

Los genes *papC* y *papEF* pertenecen al operón *pap* que sintetiza un tipo de fimbrias conocidas como fimbrias P que permiten la adherencia a células, presentando una elevada especificidad por los eritrocitos y las células epiteliales renales (Decano et al., 2021). El gen *sfa/foc* codifica también para fimbrias, las S y F1C; y *afa/dra* para adhesinas de unión al antígeno Dr. El gen *yfcV* sintetiza también una adhesina fimbrial (J. R. Johnson et al., 2015).

El hierro es un componente esencial para las bacterias, por ello, han desarrollado mecanismos para secuestrarlo y garantizar su supervivencia. El principal mecanismo de secuestro de hierro son los sideróforos, entre los que se incluyen: i) aerobactina, cuyo receptor es codificado por *iutA*; ii) salmochelina, cuyo receptor es codificado por *iroN*; iii) yersiniabactina, cuyo receptor es codificado por *fyuA*. El gen *chuA* también está relacionado con la captación de hierro, pues codifica un receptor de unión a este metal (Pokharel et al., 2023).

Tanto el gen *kpsM II* como el *iss* están implicados en la protección del patógeno mediante la evasión de la respuesta inmune (Reid et al., 2019). Otro elemento esencial para la infección bacteriana es la proteasa de membrana externa codificada por *ompT* (Köhler & Dobrindt, 2011; Pokharel et al., 2023).

El gen *vat* codifica para una toxina vacuolizante, fundamental para el éxito de infecciones del tracto urinario (J. R. Johnson et al., 2015). Por otro lado, el gen *hlyF* que codifica para una hemolisina presuntiva (Köhler & Dobrindt, 2011).

¹En la columna resultados se reflejan los patotipos asociados a cada cepa donde **E** es ExPEC, **U** es UPEC y **A** es APEC.

Ensayos de conjugación

Curva de crecimiento

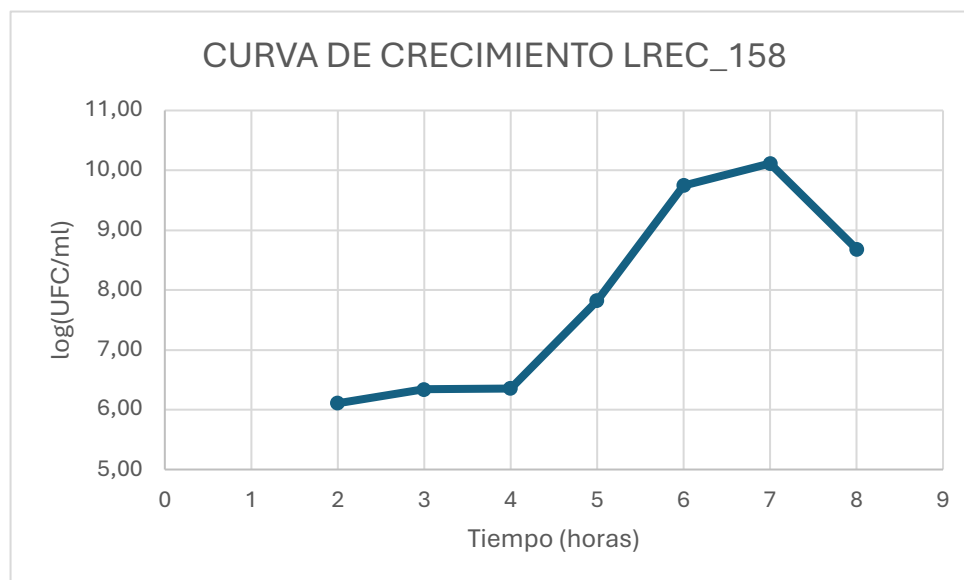
Una vez analizadas las características de las potenciales cepas donadoras y receptoras, se realizó una curva de crecimiento para establecer los puntos de corte necesarios para llevar a cabo los estudios de análisis de la frecuencia de conjugación en las distintas condiciones.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos al elaborar la curva de crecimiento en base a los resultados de las UFC/mL de la potencial cepa donadora LREC_158. En la gráfica se observa una fase de latencia de aproximadamente 4 horas, tras la cual comienza la fase exponencial que finaliza aproximadamente a la sexta

hora, dando paso a la fase de meseta que dura solamente una hora. La fase de muerte comienza a partir de la séptima hora.

Un estudio (Kahru & Vilu, 1983), caracterizó la curva de crecimiento bacteriano de una cepa *E. coli* K12 (comensal), mediante la medición del volumen celular total en medio mineral con glucosa. Obteniendo una fase de latencia de 2 horas y una fase exponencial que duraba hasta las 9 horas, momento en el cual alcanzó la fase meseta. A pesar de que la curva de crecimiento de este trabajo fue realizada en LB, un medio más rico en nutrientes y en el que las bacterias deberían crecer más fácilmente, la fase de latencia es mucho más larga y la fase exponencial mucho más corta en el caso de la cepa patógena en comparación con la cepa comensal. O, dicho de otra manera, las cepas comensales crecen mucho más rápido, lo que puede ser debido a que las cepas patógenas tienen un genoma más grande que las cepas comensales pues portan todos los genes accesorios que les permiten causar infecciones (Pokharel et al., 2023), por ello, su crecimiento es más lento.

Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas donadoras.



La fase de latencia va de las 0 a las 4 horas; la fase exponencial de las 4 a las 6 horas; la fase meseta dura solamente una hora y la fase de muerte comienza después de la séptima hora.

Conjugaciones

De las 9 cepas receptoras que cumplían las características necesarias para llevar a cabo la conjugación (LREC_153, LREC_154, LREC_155, LREC_157, LREC_158, LREC_159, LREC_160, LREC_162 y LREC_168), solo las cepas LREC_153 y LREC_154 fueron capaces de transmitir el plásmido a la cepa receptora AAG1, obteniendo los transconjugantes denominados 153-AAG1 y 154-AAG1, respectivamente. En la segunda conjugación, ambas transconjugantes de AAG1 fueron capaces de transmitir el plásmido a la cepa receptora MG1655, obteniendo los transconjugantes denominados 153-MG1655 y 154-MG1655.

Si bien en estas condiciones la frecuencia de conjugación ha sido muy baja —solo alrededor de un 20% de las cepas donadoras originales fueron capaces de llevar a cabo la conjugación—, esto es común en estudios clínicos *in vitro* (Mahérault et al., 2019). Sin embargo, en estudios anteriores (Flament-Simon, de Toro, et al.,

2020) se ha secuenciado el genoma completo de estas cepas y todas tienen al menos un plásmido conjugativo IncF, lo cual significa que potencialmente todas podrían transferir plásmidos a cepas receptoras.

Frecuencia de conjugación

Con el objetivo de analizar si la frecuencia de conjugación varía en distintas condiciones *in vitro*, se repitió el protocolo de conjugación bajo distintas condiciones nutricionales y enfrentando las suspensiones bacterianas receptora y donadora en distintos puntos de la curva de crecimiento (exponencial vs meseta). Mediante el análisis de la curva de crecimiento (Figura 1) se determinó que se considera que las bacterias están en fase exponencial a las 5 horas y en fase meseta a las 7 horas.

En todos los casos, la frecuencia de conjugación fue muy baja y no se apreciaron diferencias significativas en las distintas condiciones analizadas (Tabla 4). Sin embargo, como era de esperar, las cepas presentaron más dificultad para desarrollarse en el medio más pobre desde un punto de vista nutritivo. Además, las cepas crecidas en LB presentan, en la fase meseta, un mayor número de UFC/mL que, en fase exponencial, mientras que, de forma llamativa, en el medio mínimo esta diferencia entre fase exponencial y meseta no es apreciable.

Tabla 4. Frecuencia de conjugación de las cepas LREC_153 y LREC_154 en los medios LB y Medio mínimo sales M9 con glucosa durante la fase exponencial y estacionaria.

	LB				MM			
	5 h		7 h		5 h		7 h	
	LREC_153	LREC_154	LREC_153	LREC_154	LREC_153	LREC_154	LREC_153	LREC_154
UFC/mL TC	390	37695	7475	30065	35	240	65	0
UFC/mL TC+DN	8,20x10 ¹²	1,23x10 ¹⁰	1,63x10 ¹²	7,60x10 ¹⁰	1,55x10 ¹¹	1,59x10 ¹⁰	4,20x10 ¹¹	1,93x10 ¹³
FC	<0,001%	<0,001%	<0,001%	<0,001%	<0,001%	<0,001%	<0,001%	<0,001%

LB, medio agar LB; **MM**, medio mínimo sales M9 con glucosa y agar; **UFC/mL**, unidades formadoras de colonias/mililitro; **TC**, cepa transconjugante; **DN**, cepa donadora; **FC**, frecuencia de conjugación.

En la tabla se comparan las UFC/ml obtenidas en los medios LB y MM en dos fases diferentes del crecimiento bacteriano: fase exponencial (5 h) y fase estacionaria (7 h).

Las UFC/mL de las cepas transconjugantes exclusivamente, son aquellas que crecieron en medio suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL), mientras que las UFC/mL que incluyen tanto transconjugantes como donadoras son aquellas que crecieron en medio solamente suplementado con ampicilina. Esta diferenciación permite determinar la frecuencia de conjugación de las dos cepas capaces de llevar a cabo este proceso, en las condiciones específicas de este protocolo.

Caracterización de las cepas transconjugantes

Se han realizado numerosas investigaciones en las cuales se han caracterizado distintos linajes o clones de *E. coli* patógenos ExPEC. Estas investigaciones coinciden en que se podrían dividir los clones patógenos en dos: portadores de numerosos genes de virulencia (por ejemplo, ST73 o ST95) y portadores de un elevado número de genes de resistencia (por ejemplo, el clon ST88). Sin embargo, ST131 se caracteriza por albergar genes que codifican tanto para factores de virulencia como de resistencia, razón por la que se ha convertido en el clon de alto riesgo más expandido a nivel mundial en infecciones extraintestinales (Flament-Simon, Nicolas-Chanoine, et al., 2020). Los resultados de caracterización de las cepas transconjugantes en este trabajo parecen indicar que tanto las características de virulencia como de resistencia son transmisibles, si bien lo hacen aparentemente de forma independiente.

Caracterización fenotípica

Fenotipo

La tabla 5 resume las principales características analizadas en las cepas transconjugantes. Como se puede observar en la tabla, a pesar de que las cepas donadoras fueran móviles, la conjugación no llevó a las cepas receptoras AAG1 (mutantes no móviles) a la ganancia de esta característica. Las transconjugantes MG1655 si presentaban movilidad debido a que la cepa receptora MG1655 era intrínsecamente móvil. Además, aunque la cepa LREC_153 mostró un fenotipo α -hemolítico, ninguno de sus transconjugantes lo hizo, lo que permite asumir que aparentemente los genes capaces de degradar glóbulos rojos no se transfirieron.

Tabla 5. Caracterización fenotípica de los transconjugantes y comparativa con los fenotipos de las cepas receptoras y donadoras.

	Gram	Lac	Morfología	Movilidad	Hemólisis
LREC_153	-	+	Lisa-Redonda	+	+
LREC_154	-	+	Lisa- Redonda	-	-
153-AAG1	-	-	Lisa-Redonda	-	-
154-AAG1	-	-	Lisa- Redonda	-	-
153-MG1655	-	+	Lisa- Redonda	+	-
154-MG1655	-	+	Lisa-Redonda	+	-
AAG1	-	-	Lisa- Redonda	-	-
MG1655	-	+	Lisa- Redonda	+	-

Las cepas se sembraron en agar MacConkey Lactosa para confirmar que eran gramnegativas, además de caracterizar su capacidad para metabolizar lactosa y su morfología. Por otro lado, las cepas se sembraron en medio semisólido MIL para comprobar su movilidad y en placas de agar sangre comercial para confirmar su capacidad de degradar glóbulos rojos.

La única con capacidad hemolítica fue la cepa LREC_153, la cual mostró un fenotipo α -hemólisis.

Perfil de resistencia

En la tabla 6 se muestran los resultados de los antibiogramas de las cepas transconjugantes, comparados con los antibiogramas de las cepas donadoras y receptoras.

Tabla 6. Comparativa de los antibiogramas de las cepas donadoras, receptoras y transconjugantes por los criterios CLSI y EUCAST.

CEPA	DISCO DE ANTIBIÓTICO								
	AM10	AMC30	CZ30	SXT25	D30	TE30	C30	NAL30	GM10
LREC_153	R	R*	R	R	I	R	S	R	R
153-AAG1	R	R	R	S	S	S	R	S	S
153-MG1655	R	R	R*	S	S	S	S	S	S
LREC_154	R	R	I	S	S	S	S	R	S
154-AAG1	R	R	I	S	S	S	R	S	S
154-MG1655	R	R	I	S	S	S	S	S	S
AAG1	S	S	S	S	S	S	R	S	S
MG1655	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R, resistente; S, sensible; I, intermedio; MDR, multiresistente; AM10, ampicilina, AMC30, amoxicilina-clavulánico; CZ30, cefazolina; SXT25, cotrimoxazol; D30, doxiciclina; TE30, tetraciclina; C30, cloranfenicol; NAL30, ácido nalidíxico; GM10, gentamicina.

Además de los antimicrobianos que figuran en la tabla, también se analizaron por el método de difusión de discos: cefuroxima (CXM30), cefoxitina (FOX30), ceftazidima (CAZ30), ceftriaxona (CRO30), aztreonam (ATM30), imipenem (IMP10),

ciprofloxacina (CIP5) y amikacina (AN30). Sin embargo, no se incluyeron en la tabla debido a que todas las cepas fueron sensibles a estos antimicrobianos.

En la tabla, los antimicrobianos se encuentran ordenados por familias, de manera que, cada color hace referencia a una familia de antibióticos.

En la tabla figura un resumen conjunto de los datos analizados bajo los criterios EUCAST y CLSI. Si bien de manera general, ambos criterios coincidieron en los antimicrobianos, hubo algunos datos que no, son aquellos representados con *. Los resultados para el antibiótico amoxicilina-clavulánico fueron indeterminados bajo el criterio CLSI para LREC_153, pero como bajo el criterio EUCAST son resistentes, por lo que se interpretan como tal. Por otro lado, la cepa 153-MG1655 mostró un fenotipo intermedio para el antibiótico cefazolina y este dato no pudo comprobarse bajo el criterio EUCAST, sin embargo, se interpretó como resistente debido a que tanto LREC_153 como 153-AAG1 lo eran.

Caracterización molecular

La tabla 7 incluye los resultados, obtenidos por PCR convencional, de: i) la identificación de genes de virulencia, ii) la identificación de genes de resistencia y iii) clasificación de familias de plásmidos. Estos datos han permitido identificar qué plásmido/s se transmitieron, así como los genes que portaban, además de confirmar los resultados de los análisis fenotípicos.

Tabla 7. Resultados de las PCR de diagnóstico realizadas a las cepas LREC_153, LREC_154, AAG1, MG1655 y las transconjugantes (153-AAG1, 153-MG1655, 154-AAG1 y 154-MG1655).

Gen	Cepa							
	LREC_153	153-AAG1	153-MG1655	LREC_154	154-AAG1	154-MG1655	AAG1	MG1655
MOB ¹								
<i>MOBH11</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>MOBP3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MOBP51</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>MOBP13</i>	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>MOBF12</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>MOBQ12</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Inc ²								
<i>FiA</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>FiB</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>FiII</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
Resistencia ³								
<i>blaTEM</i>	1	1	1	1	1	1	0	0
<i>blaSHV</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>blaCTX-M</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mcr-1</i>	0	0	0	1	1	1	0	0
<i>cat</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
Virulencia ⁴								
<i>chua</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>iroN</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>iucD</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>iutA</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>fyuA</i>	1	0	0	1	0	0	0	0

Tabla 7. Continuación.

Gen	Cepa							
	LREC_153	153-AAG1	153-MG1655	LREC_154	154-AAG1	154-MG1655	AAG1	MG1655
	Virulencia ⁴							
<i>hlyF</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>hlyA</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>tsh</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>vat</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>yfcV</i>	1	0	0	1	0	0	0	0

La tabla se divide en 4 categorías: las dos primeras tratan sobre genes que permiten tipar al plásmido mediante MOB e Inc, respectivamente; la tercera se centra en genes de resistencia que pueden portar los plásmidos y, por tanto, haber sido transferidos a las cepas receptoras y por último los factores de virulencia.

¹Se analizaron los genes de tipado MOB que se dividieron siguiendo un código de colores en función de la familia MOB a la que pertenecían: MOB_H, MOB_P y MOB_F.

²También se analizaron los genes de tipado Inc, todos ellos asociados a la familia IncF.

³Los genes de resistencia analizados fueron a ampicilina (*blaTEM*, *blaSHV* y *blaCTX-M*), colistina (*mcr-1*) y cloranfenicol (*cat*).

⁴Los genes de virulencia analizados se dividieron según su función: captación de hierro (*chua*, *iroN*, *iucD*, *iutA* y *fyuA*), producción de toxinas (*vat*, *tsh*, *hlyF* y *hlyA*) y adherencia (*yfcV*)

La cepa LREC_153 vehicula potencialmente los siguientes genes *MOB_{H11}*, *MOB_{P51}*, *MOB_{F12}*, *MOB_{P13}*, *FiA*, *FiII*, *blaTEM*, *chua*, *hlyF*, *hlyA*, *iroN*, *iucD*, *iutA*, *fyuA* e *yfcV*. De ellos solo se traspasaron a las cepas transconjugante 153-AAG1 y 153-MG1655 los genes *MOB_{P13}* y *blaTEM*. Por otro lado, la cepa LREC_154 vehicula potencialmente los genes *blaTEM*, *mcr-1*, *chua*, *fyuA* e *yfcV*, de los cuales transfirió a los transconjugantes 154-AAG1 y 154-MG1655 los genes *blaTEM* y *mcr-1*. El gen *cat*, que aporta resistencia al cloranfenicol, como era de esperar, solamente lo presentan las cepas AAG1, 153-AAG1 y 154-AAG1. El resto de los genes buscados por PCR no se detectaron en ninguna de las cepas (Tabla 7).

¿Qué plásmidos se transfirieron?

Tabla 8. Tabla resumen de las características de los plásmidos presentes en las cepas LREC_153 y LREC_154 (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020).

Cepa	Plásmido	Relaxasa	Grupo Inc	Potencial capacidad de transferencia
LREC_153	pLREC153_1	MOB _{F12} ; MOB _{H11}	IncF	Conjugativo
	pLREC153_2	MOB _{P13}	IncL/M	Conjugativo
	pLREC153_3	MOB _{P51}	ColE1-like	Movilizable
	pLREC153_4	MOB _{V2}	nd	Movilizable
LREC_154	pLREC154_1	MOB _{F12}	IncF	Conjugativo
	pLREC154_2	MOB _{P3}	IncX4	Conjugativo

nd, no detectado. El plásmido pLREC153_1 presenta presuntivamente una cointegración, de ahí la presencia de dos relaxasas.

Cepa LREC_153

En estudios anteriores mediante WGS (*Whole Genome Sequencing*) (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020) se estableció que la cepa LREC_153 porta 4 plásmidos: pLREC153_1, pLREC153_2, pLREC_153_3 y pLREC153_4, de los cuales tienen capacidad conjugativa los dos primeros (Tabla 8).

En este trabajo, se realizó la detección por PCR de las relaxasas asociadas a estos plásmidos, poniendo especial interés en los plásmidos conjugativos. Se lograron confirmar todos los plásmidos previamente identificados con excepción de MOB_{V2}, ya que al ser una variante poco frecuente no se disponía de los cebadores necesarios para su identificación (Tabla 7). Los ensayos de conjugación realizados han confirmado la capacidad de LREC_153 para conjugarse y transferir horizontalmente la resistencia a la ampicilina (Tabla 6). Por PCR se corroboró que el plásmido responsable de transmitir esta resistencia es el plásmido pLREC153_2 asociado a una relaxasa MOB_{P13}, propia de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncL/M (Tabla 8). La reconstrucción genómica confirmó que se trataba de un plásmido de gran tamaño (102,056 pb) con un bajo número de copias, características propias de plásmidos conjugativos. Esto es coherente con lo que normalmente se espera de un plásmido IncL/M (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). Una característica destacada de los plásmidos IncL/M es su capacidad para diseminarse entre distintas especies bacterianas, lo que permite clasificarlos como plásmidos de amplio rango de hospedadores (Rozwandowicz et al., 2018).

Además, el gen *blaTEM* fue el responsable de aportar esta resistencia a ampicilina tanto en la cepa donadora como en ambas transconjugantes (153-AAG1 y 153-MG1655) como se confirmó por PCR (Tabla 7). Esto significa que el gen *blaTEM* es vehiculado por el plásmido pLREC153_2.

El gen *blaTEM* pertenece a la familia de genes que codifican para las betalactamasas. Este gen codifica para betalactamasas de espectro estrecho, capaces de inhibir penicilinas y cefalosporinas de primera generación (Shaikh et al., 2015). Todo ello concuerda con los resultados del antibiograma, pues tanto la cepa LREC_153 como sus transconjugantes presentan resistencia a ampicilina (penicilina) y cefazolina (cefalosporina de primera generación) (Tabla 6).

Otro aspecto relevante es la resistencia que presentaba tanto LREC_153 como sus transconjugantes a la amoxicilina-clavulánico (Tabla 6). La amoxicilina, al ser una penicilina, puede ser inactivada por la β -lactamasa codificada por el gen *blaTEM*, sin embargo, al administrarse en combinación con ácido clavulánico —un inhibidor de β -lactamasas— se esperaría una restauración de su actividad antimicrobiana. Por ello, resulta llamativo que la cepa muestre resistencia a este compuesto.

Una posible explicación radica en la sobreexpresión del gen *blaTEM*, la cual puede originarse por mutaciones puntuales en la región promotora o por duplicación del gen, mecanismos que han sido documentados previamente (Hansen et al., 2019). Esta sobreexpresión podría superar la capacidad inhibitoria del ácido clavulánico, permitiendo así que se mantenga la resistencia. Es probable que estas mutaciones hayan sido seleccionadas bajo presión por el uso excesivo de antibióticos, favoreciendo la adaptación bacteriana. En resumen, la sobreexpresión de *blaTEM*, ofrece una explicación plausible a la resistencia detectada.

Por otro lado, si bien en la cepa LREC_153 se detectaron diversos factores de virulencia, ninguno de ellos fue transferido a las cepas transconjugantes (Tabla 7). Esto se debe a que dichos genes estaban localizados en el cromosoma bacteriano o en plásmidos que no se transfirieron, en particular en el plásmido pLREC153_1, que alberga un replicón de incompatibilidad IncF (Tabla 8).

En cuanto a la movilidad de las cepas, esta no se vio afectada por la transferencia del plásmido. La cepa LREC_153 es móvil, pero el plásmido transferido no confería movilidad a la cepa 153-AAG1, ya que esta permanecía no móvil tanto antes como después de adquirirlo. En contraste, la cepa MG1655, que ya era móvil, conservó su capacidad tras la adquisición del plásmido (Tabla 5). Esto indica que este plásmido no afecta la movilidad bacteriana.

La capacidad hemolítica —es decir, la habilidad de lisar eritrocitos para obtener hierro, un nutriente limitante— tampoco se transfirió mediante el plásmido a las cepas transconjugantes. Aunque LREC_153 presentó una α -hemólisis en placa (Tabla 5) y portaba los genes *hlyA* y *hlyF* (Tabla 7), ninguno de los transconjugantes reveló esta actividad hemolítica. De manera que, el plásmido transferido no portaba estos genes y, por tanto, no confería la capacidad de lisar glóbulos rojos.

Cepa LREC_154

La cepa LREC_154 presenta dos plásmidos: pLREC154_1 y pLREC154_2, ambos conjugativos (Tabla 8). La hipótesis principal planteaba que el plásmido pLREC154_2 perteneciente a la familia de relaxasa MOB_{P3}, relacionado con el replicón Incx4, era el que se había transferido. Los plásmidos IncX se caracterizan por presentar un espectro reducido de hospedadores y un tamaño que varía entre los 30-40 kb (Rozwandowicz et al., 2018).

Ninguno de los plásmidos previamente descritos en LREC_154 pudieron ser identificados con los cebadores empleados en este trabajo en la cepa salvaje y, por tanto, tampoco se encontraron en las transconjugantes. Esto podría deberse a la pérdida de los plásmidos a raíz de los numerosos reislamientos realizados en medios no selectivos. No obstante, a pesar de no haber sido detectado ningún plásmido por PCR, se lograron obtener transconjugantes *mcr-1* y *blaTEM* positivos, al igual que la cepa donadora original, lo cual evidencia la existencia de algún sistema de transferencia horizontal de genes.

Se ha comprobado que los cebadores utilizados en este trabajo no eran lo suficientemente específicos para la detección de los genes MOB de LREC_154, razón por la cual no se pudo confirmar la presencia del gen MOB_{P3} ni MOB_{F12} en esta donadora, aunque este último aparentemente no se transfirió.

Con toda esta información y los resultados obtenidos, la hipótesis más plausible es que el gen *mcr-1* esté integrado en el cromosoma, como se observó en el análisis *in silico* realizado anteriormente (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). Es común encontrar este gen flaqueado por dos copias del elemento de inserción ISAp11 formando el transposón compuesto Tn6330, lo que facilita su transferencia entre el cromosoma y plásmidos entre los que se incluyen los plásmidos IncX4, IncHI2, IncI2 y IncP (Zhang et al., 2021). Por ello, es posible que el gen *mcr-1*, haya saltado del cromosoma al plásmido IncX4 y gracias a eso haya conseguido transferirse mediante conjugación.

Este fenómeno recalca la importancia de la secuenciación *de novo* frente a una secuenciación tomando una referencia (mapeo en base a genomas de referencia) cuando se trata de la secuenciación de elementos genéticos

móviles. Cuando se toma una secuencia de referencia se están ignorando posibles reordenamientos genéticos causados por secuencias de inserción, transposones y otros genes propios del genoma accesorio, afectando negativamente a la posibilidad de identificar variaciones estructurales como sería el paso del gen *mcr-1* del cromosoma a plásmidos mediado por Tn6330 (Flament Simon, 2021).

Por tanto, el plásmido pLREC154_2 sí se transmite, si bien no puede ser detectado por PCR. Para confirmar esta hipótesis es necesario una investigación más extensa que requeriría una secuenciación del genoma completo, un diseño de cebadores más específicos para la variante del gen *MOB_{P3}* presente en las cepas ST131 porcinas y completar la caracterización con la búsqueda por PCR del gen asociado a la familia IncX4.

Por otro lado, es probable que el gen *bla_{TEM}* presente en las cepas LREC_154, 154-AAG1 y 154-MG1655 (Tabla 7) también haya sido vehiculado por el plásmido pLREC154_2, pues es aparentemente el único plásmido que ha conseguido transferirse. Además, estos resultados coinciden con la reconstrucción presuntiva del plasmidoma realizada en trabajos anteriores (Flament-Simon, de Toro, et al., 2020). Gracias a esta transferencia, las cepas transconjugantes presentan resistencia a la ampicilina. Además, al igual que pasaba con la cepa LREC_153, probablemente el gen *bla_{TEM}* se encuentre sobreexpresado, razón por la cual presentan resistencia al antibiótico amoxicilina-clavulánico (Tabla 6).

Como se ha comentado anteriormente, ST131 presenta una amplia gama tanto de factores de virulencia como de genes de resistencia, motivo por el cual esta cepa es tan peligrosa. Mediante la caracterización de los plásmidos de este trabajo se ha podido comprobar una presuntiva asociación entre IncF y la transmisión de factores de virulencia que también ha sido corroborada por trabajos previos (Bihannic et al., 2016; Flament-Simon, de Toro, et al., 2020), mientras que los genes de resistencia son vehiculizados por plásmidos de otras familias como IncX4 o IncL/M.

Ni la cepa LREC_153 ni LREC_154 fueron capaces de transferir el plásmido IncF, razón por la cual tampoco fueron capaces de transferir factores de virulencia. El hecho de que esta familia de plásmidos no haya podido transferirse en ninguna de las 9 potenciales cepas donadoras, no quiere decir que no sea capaz de hacerlo, si no que posiblemente las condiciones *in vitro* en las que se ha llevado a cabo el protocolo no sean las adecuadas para ello.

Como se ha mencionado anteriormente y se ha evidenciado en los resultados de este estudio, una de las principales vías de diseminación de la resistencia a los antibióticos es a través de plásmidos que transportan los genes responsables de dichas resistencias. En este contexto, la inhibición de conjugación mediante el desarrollo de COINs representa una estrategia prometedora para frenar esta propagación.

Perspectivas futuras

- Todos los resultados de este trabajo han sido obtenidos en condiciones *in vitro*. Si bien estudios han observado diferencias cuantitativas en las frecuencias de conjugación *in vitro* e *in vivo*, también se ha observado en su mayoría una correspondencia cualitativa con respecto a los tipos de plásmidos más

propensos a transferirse, así como las compatibilidades entre plásmidos y distintos tipos de cepas hospedadoras, lo que sugiere la posibilidad de predecir el comportamiento de los plásmidos *in vivo* a partir de resultados *in vitro* (Benz et al., 2021). Por tanto, en estudios futuros sería interesante ajustar las condiciones *in vitro* para conseguir un resultado más preciso de la frecuencia de conjugación que se asemeje al comportamiento de los plásmidos en la naturaleza. En particular, buscar las condiciones óptimas de la conjugación para plásmidos IncF en cepas *E. coli* de origen clínico.

- Algunos de los genes buscados por PCR relacionados con la tipificación plasmídica no mostraron amplificación, aunque se esperaba un resultado positivo. Concretamente, los genes *MOB_{F12}* y *MOB_{P3}* no amplificaron en la cepa LREC_154. Al trabajar con cepas porcinas ST131, variantes muy poco frecuentes y atípicas, convendría diseñar cebadores específicos basándonos en la secuenciación de los genomas completos de nuestras cepas.
- Las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS) incluyen la secuenciación de segunda generación (SGS) y de tercera generación (TGS). Las cepas porcinas ST131 clado B fueron secuenciadas mediante SGS utilizando un enfoque *de novo*, es decir, sin ningún genoma de referencia. Uno de los principales problemas de la SGS es su limitada longitud de lectura (35-700 pb), lo que dificulta la reconstrucción del genoma cuando este presenta múltiples elementos repetitivos cortos. Esta característica es típica de los plásmidos que presentan múltiples copias de elementos móviles originando estas regiones repetitivas, aumentando inevitablemente el número de *contings* y haciendo que genes localizados en medio de esas repeticiones se encuentre en diferentes *contings*, dificultando la interpretación de los resultados. Por otro lado, aunque más costosa, la TGS tiene un rango de lectura más amplio (10-100 kb) lo que evitaría errores en la reconstrucción del genoma (Boolehandani et al., 2019; Flament Simon, 2021; Lu et al., 2016; Orlek, Stoesser, et al., 2017), por lo que en futuros trabajos podría llevarse a cabo este tipo de secuenciación con el objetivo de confirmar la reconstrucción presuntiva del plasmidoma.

CONCLUSIONES

- Los métodos empleados para caracterizar las cepas donadoras han permitido seleccionar a aquellas que cumplían las condiciones necesarias: resistencia a la ampicilina y sensibilidad al cloranfenicol, para poder llevar a cabo el protocolo de conjugación. Nueve de las 11 cepas ST131 iniciales eran las que cumplían estos criterios.
- Solamente 2 de las 9 cepas potencialmente donadoras de este ensayo (LREC_153 y LREC_154) fueron capaces de llevar a cabo la conjugación, es decir, solamente alrededor de un 20% de las cepas son capaces de transmitir al menos un plásmido. Además, la frecuencia de conjugación de ambas cepas fue muy baja (<0,001%).
- Por PCR se determinaron los plásmidos transferidos a las cepas receptoras. La cepa LREC_153 transfirió el plásmido pLREC_153 perteneciente a las familias MOB_{P13} e IncL/M que confirió el gen *blaTEM* a las cepas receptoras. Por su parte, la cepa LREC_154 transfirió presuntivamente el plásmido pLREC154_2 perteneciente a las familias MOB_{P3} e IncX4 que aportó no solo el gen de resistencia *blaTEM* sino también *mcr-1*. Sin embargo, se requiere investigación adicional para confirmar esta última transferencia. Además, la transmisión de genes de resistencia, pero no de genes de virulencia permite teorizar que la diseminación de estos es independiente.
- La caracterización fenotípica de las cepas transconjugantes permitió confirmar los datos obtenidos por PCR. Aparentemente, los plásmidos transferidos no alteran ninguna característica de la cepa receptora original salvo su resistencia a antibióticos que se ve aumentada. Además, gracias a los estudios fenotípicos se puede presuponer que en ambas cepas hay una sobreexpresión del gen *blaTEM* debido a la presencia de resistencia a la amoxicilina-clavulánico. Por tanto, la validación de los resultados genotípicos mediante estudios fenotípicos resulta esencial, ya que la presencia de un gen en una bacteria no implica necesariamente su expresión.

BIBLIOGRAFÍA

- Åberg, A., Shingler, V., & Balsalobre, C. (2008). Regulation of the fimB promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA in vivo. *Molecular Microbiology*, 67(6), 1223–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06115.x>
- Ahmed, M. O., Abouzeed, Y. M., & Daw, M. A. (2025). Global initiatives to phase-out colistin use in food-producing animals. *Open Veterinary Journal*, 15(2), 533. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2025.v15.i2.4>
- Alalam, H., Graf, F. E., Palm, M., Abadikhah, M., Zackrisson, M., Mattsson, M., Hadjineophytou, C., Persson, L., Stenberg, S., & Ghiaci, P. (2018). Conjugation factors controlling F-plasmid antibiotic resistance transmission. *BioRxiv*, 271254. <https://doi.org/10.1101/271254>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: an overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C. (2020). Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms*, 8(11), 1716. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111716>
- Barry, A. L., Thornsberrry, C., Jones, R. N., & Gerlach, E. H. (1980). Interpretive standards for disk susceptibility tests with Sch 21420 and amikacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(4), 616–621.
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. S. (2022). Escherichia coli: an overview of main characteristics. *Escherichia Coli-Old and New Insights*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105508>
- Benz, F., Huisman, J. S., Bakkeren, E., Herter, J. A., Stadler, T., Ackermann, M., Diard, M., Egli, A., Hall, A. R., & Hardt, W.-D. (2021). Plasmid-and strain-specific factors drive variation in ESBL-plasmid spread in vitro and in vivo. *The ISME Journal*, 15(3), 862–878. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00819-4>
- Bihannic, M., Haenni, M., Oswald, E., & Madec, J.-Y. (2016). Divergent evolution of the repFII replicon of IncF plasmids carrying cytotoxic necrotizing factor cnf2, cytolethal distending toxin cdtIII, and fl7Ae fimbrial variant genes in type 2 necrotoxicogenic Escherichia coli isolates from calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 510–517. <https://doi.org/10.1128/AEM.02641-15>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of E. coli. *Elife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*, 20(6), 356–370. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- 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/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in Escherichia coli, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, 52(3), 375–395.
- Decano, A. G., Tran, N., Al-Foori, H., Al-Awadi, B., Campbell, L., Ellison, K., Mirabueno, L. P., Nelson, M., Power, S., & Smith, G. (2021). Plasmids shape the diverse accessory resistomes of Escherichia coli ST131. *Access Microbiology*, 3(1), 000179. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000179>

- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(1), 37–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Despotovic, M., de Nies, L., Busi, S. B., & Wilmes, P. (2023). Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Current Opinion in Microbiology*, *73*, 102291. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102291>
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., & Morand, S. (2018). The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*, 14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>
- Dong, H., Xiang, H., Mu, D., Wang, D., & Wang, T. (2019). Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the *mcr-1* gene from *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *53*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.017>
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C., & Curtiss III, R. (2000). Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity*, *68*(7), 4145–4154. <https://doi.org/10.1128/iai.68.7.4145-4154.2000>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*, 90–103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
- Flament Simon, S. C. (2021). Molecular Characterization of Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and Clones Causing Extraintestinal Infections in Humans. Animals as Reservoir of High-Risk *E. coli* Clones Pathogenic for Humans. (Tesis doctoral, Universidade de Santiago de Compostela). Repositorio Minerva. <https://minerva.usc.es/entities/publication/5a567556-c44e-4da8-acf2-d37e501dfca4>
- Flament-Simon, S. C., de Toro, M., Mora, A., García, V., García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., Herrera, A., & Blanco, J. (2020). Whole genome sequencing and characteristics of *mcr-1*–harboring plasmids of porcine *Escherichia coli* isolates belonging to the high-risk clone O25b: H4-ST131 clade B. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00387>
- 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), 161. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040161>
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., & de la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 936–956. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00291.x>
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., & de la Cruz, F. (2023). Plasmid classifications. *Plasmid*, *126*, 102684. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2023.102684>
- Ghasemian, A., Shafiei, M., Hasanvand, F., & Mostafavi, S. K. S. (2018). Carbapenem and colistin resistance in Enterobacteriaceae: worldwide spread and future perspectives. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, *29*(4), 173–176. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000142>
- Graf, F. E., Palm, M., Warringer, J., & Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Development Research*, *80*(1), 19–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21457>
- 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. <https://doi.org/10.1101/SQB.1981.045.01.022>
- Habouria, H., Pokharel, P., Maris, S., Garénaux, A., Bessaiah, H., Houle, S., Veyrier, F. J., Guyomard-Rabenirina, S., Talarmin, A., & Dozois, C. M. (2019). Three new serine-protease autotransporters of

- Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney. *Virulence*, *10*(1), 568–587. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1624102>
- Hannan, T. J., Mysorekar, I. U., Chen, S. L., Walker, J. N., Jones, J. M., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J., & Seed, P. C. (2008). LeuX tRNA-dependent and-independent mechanisms of *Escherichia coli* pathogenesis in acute cystitis. *Molecular Microbiology*, *67*(1), 116–128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06025.x>
- Hansen, K. H., Andreasen, M. R., Pedersen, M. S., Westh, H., Jelsbak, L., & Schönning, K. (2019). Resistance to piperacillin/tazobactam in *Escherichia coli* resulting from extensive IS 26-associated gene amplification of bla TEM-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(11), 3179–3183. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz349>
- Johnson, J. R., Porter, S., Johnston, B., Kuskowski, M. A., Spurbeck, R. R., Mobley, H. L. T., & Williamson, D. A. (2015). Host characteristics and bacterial traits predict experimental virulence for *Escherichia coli* bloodstream isolates from patients with urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, *2*(3), ofv083. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv083>
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary Jr, J. C., & Stell, A. L. (2000). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and ironE, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, *68*(5), 3040–3047. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.3040-3047.2000>
- 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>
- Kahru, A., & Vilu, R. (1983). On characterization of the growth of *Escherichia coli* in batch culture. *Archives of Microbiology*, *135*, 12–15.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 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. *Pathogens*, *10*(4), 467. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>
- Köhler, C.-D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(8), 642–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006>
- Le Bouguenec, C., Archambaud, M., & Labigne, A. (1992). Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(5), 1189–1193. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1189-1193.1992>
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Between Pathogenicity and Commensalism*, 3–32. https://doi.org/10.1007/82_2012_303
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., & Huang, X. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *14*(5), 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>

- Ma, J., Cheng, Z., Bai, Q., Zhao, K., Pan, Z., & Yao, H. (2021). Screening virulence factors of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (an emerging pathotype) required for optimal growth in swine blood. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(4), 2005–2016. <https://doi.org/10.1111/TBED.13848>
- Mahéroult, A. C., Kemble, H., Magnan, M., Gachet, B., Roche, D., Le Nagard, H., Tenaillon, O., Denamur, E., Branger, C., & Landraud, L. (2019). Advantage of the F2: A1: B-IncF pandemic plasmid over IncC plasmids in in vitro acquisition and evolution of bla CTX-M gene-bearing plasmids in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(10), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/AAC.01130-19>
- Monger, X. C., Gilbert, A.-A., Saucier, L., & Vincent, A. T. (2021). Antibiotic resistance: from pig to meat. *Antibiotics*, *10*(10), 1209. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101209>
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., & Blanco, M. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, *167*(3–4), 506–512. <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 & Disease*, *1*(3), 160–165. <https://doi.org/10.1089/fpd.2004.1.160>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 481–511. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nagamatsu, K., Hannan, T. J., Guest, R. L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., Dodson, K., Raivio, T. L., & Hultgren, S. J. (2015). Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(8), E871–E880. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500374112>
- Organization, W. H. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- Orlek, A., Phan, H., Sheppard, A. E., Doumith, M., Ellington, M., Peto, T., Crook, D., Walker, A. S., Woodford, N., & Anjum, M. F. (2017). Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. *Plasmid*, *91*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.002>
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Walker, A. S., & Phan, H. (2017). Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00182>
- Palencia-Gándara, C., Getino, M., Moyano, G., Redondo, S., Fernández-López, R., González-Zorn, B., & de la Cruz, F. (2021). Conjugation inhibitors effectively prevent plasmid transmission in natural environments. *MBio*, *12*(4), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/mBio.01277-21>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, *6*(4), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The diversity of *Escherichia coli* pathotypes and vaccination strategies against this versatile bacterial pathogen. *Microorganisms*, *11*(2), 344. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., Van Duijkeren, E., Mateus, A., Moreno, M. A., Pyörälä, S., & Ružauskas, M. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(4), 957–968. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
- 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., McKinnon, J., & Djordjevic, S. P. (2019). Clonal ST131-H 22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microbial Genomics*, 5(9), e000295. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000295>
- Ripoll-Rozada, J., García-Cazorla, Y., Getino, M., Machón, C., Sanabria-Ríos, D., de la Cruz, F., Cabezón, E., & Arechaga, I. (2016). Type IV traffic ATPase TrwD as molecular target to inhibit bacterial conjugation. *Molecular Microbiology*, 100(5), 912–921. <https://doi.org/10.1111/mmi.13359>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1753–1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
- Sahoo, S., Mohanty, J. N., Routray, S. P., Khandia, R., Das, J., Shah, S., & Swarnkar, T. (2023). Colistin the last resort drug in 21st century antibiotics to combat Multidrug resistance superbugs. *J. Exp. Biol. Agric. Sci*, 11, 919–929. [https://doi.org/10.18006/2023.11\(6\).919.929](https://doi.org/10.18006/2023.11(6).919.929)
- Shahbazi, R., Salmanzadeh-Ahrabi, S., Aslani, M. M., Alebouyeh, M., Falahi, J., & Nikbin, V. S. (2023). The genotypic and phenotypic characteristics contributing to high virulence and antibiotics resistance in *Escherichia coli* O25-B2-ST131 in comparison to non-O25-B2-ST131. *BMC Pediatrics*, 23(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12887-023-03866-w>
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Spurbeck, R. R., Dinh Jr, 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>
- Villa, L., & Carattoli, A. (2020). Plasmid typing and classification. *Horizontal Gene Transfer: Methods and Protocols*, 309–321. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_22
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes*, 11(11), 1239. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- Wang, X., Wang, H., Zhang, J., Huang, Y., Wu, Y., Wang, Y., & Zhang, R. (2025). Morphological variability of *Escherichia coli* colonizing human wounds: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 25(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10484-7>
- Wasteson, Y. (2001). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(Suppl 1), S79.
- Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-associated urinary tract infections: the molecular basis for challenges to effective treatment. *Microorganisms*, 11(9), 2169. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>
- Wiles, T. J., & Mulvey, M. A. (2013). The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives. *Future Microbiology*, 8(1), 73–84. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.131>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., & Ochman, H. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

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>

Yu, D., Banting, G., & Neumann, N. F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, *67*(8), 553–571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>

Zhang, S., Abbas, M., Rehman, M. U., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., & Gao, Q. (2021). Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of the Total Environment*, *799*, 149280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>

ANEXOS

Anexo I

Tabla 9. *Primers* utilizados para la determinación de los patotipos ExPEC, UPEC y APEC.

Patotipo	Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) anillamiento	Referencia
ExPEC	<i>papC</i>	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	0,5	205	60	(J. R. Johnson et al., 2015)
		Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA				
	<i>papEF</i>	PAPEFF	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	0,5	336	62	(Yamamoto et al., 1995)
		PAPEFR	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA				
	<i>sfa/focDE</i>	sfa 1	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC	0,5	410	64	(Le Bouguenec et al., 1992)
		sfa 2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA				
<i>afa/draBC</i>	afa 1	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	0,5	750	64	(Le Bouguenec et al., 1992)	
	afa 2	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG					
<i>iutA</i>	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	0,5	301	64	(J. R. Johnson et al., 1997)	
	Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG					
<i>kpsM II</i>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	0,5	272	64	(J. R. Johnson & Stell, 2000)	
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA					
UPEC	<i>vat</i>	Forward	TCAGGACACGTTTCAGGCATTTCAGT	0,5	1100	66	(Spurbeck et al., 2012)
		Reverse	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
	<i>fyuA</i>	Forward	GTAAACAATCTTCCCGCTCGGCAT	0,5	850	66	(Spurbeck et al., 2012)
		Reverse	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
<i>yfjV</i>	Forward	ACATGGAGACCACGTTTCACC	0,5	292	66	(Spurbeck et al., 2012)	
	Reverse	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG					
<i>chuA</i>	ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	1	288	58	(Clermont et al., 2013)	
	ChuA.2b	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				(Clermont et al., 2000)	

Tabla 9. Continuación.

Patotipo	Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	T ^a (°C) anillamiento	Referencia
APEC	<i>ompT</i>	Forward	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	1	559	60	(J. R. Johnson et al., 2015)
		Reverse	CCCGGGTCATAGTGTTTCATC				
	<i>hlyF</i>	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAA	0,5	444	60	(Morales et al., 2004)
		Reverse	TTTGCCGGTTTAGGCATTCC				
	<i>iutA</i>	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	0,5	301	64	(J. R. Johnson et al., 1997)
Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG						
<i>iroN</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCCG	0,3	685	66	(J. R. Johnson et al., 2000)	
Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG						
<i>iss</i>	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	0,3	323	66	(T. J. Johnson et al., 2008)	
is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA						

Los *primers* estaban a una concentración de 20 μM.

Anexo II

Tabla 10. *Primers* utilizados para la caracterización de los plásmidos transferidos.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	Tª (°C) anillamiento	Referencia
MOB						
<i>MOB_{H11}</i> ¹	H11-f	CCGGCGTCGGAGAAAYCAYCAYCA	1	207	60	(Villa & Carattoli, 2020)
	H11-r	AAGGTCGTATACCTTYCCKGCRCTCRG				
<i>MOB_{P3}</i> ¹	P3-f	CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT	1	177	55	(Villa & Carattoli, 2020)
	P3-r	CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC				
<i>MOB_{P51}</i> ¹	P51-f	TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC	1	167	55	(Villa & Carattoli, 2020)
	P5-r	CCCTTGTCTGGTGYTSNACCCA				
<i>MOB_{F12}</i> ¹	F12-f	AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAAYTAYTA	1	234	55	(Villa & Carattoli, 2020)
	F1-r	ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC				
<i>MOB_{Q12}</i> ¹	Q12-f	CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGC	1	341	55	(Villa & Carattoli, 2020)
	Q12-r	ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTRAARWAYTG				
<i>MOB_{P13}</i> ¹	P131-f	AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT	1	180	60	(Villa & Carattoli, 2020)
	P1-r	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTRTCNGTRTC				
Inc						
<i>IncFI_FIA</i> ¹	FIA FW	CCATGCTGGTCTAGAGAAGGTG	1	462	60	(Villa & Carattoli, 2020)
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG				
<i>IncFI_FIB</i> ¹	FIB FW	TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC	1	682	60	(Villa & Carattoli, 2020)
	FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGCATT				
<i>IncFII</i> ¹	FII FW	CTGATCGTTTAAGGAATTTT	1	258-262	55	(Villa & Carattoli, 2020)
	FII RV	CACACCATCCTGCACTTA				
Resistencia						
<i>blaTEM</i> ¹	TEM-1F	ATGAGTATTC AACATTTCCG	1	868	58	(Rasheed et al., 1997)
	TEM-1R	CTGACAGTTACCAATGCTTA				
<i>blaSHV</i> ¹	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC	0,5	879	64	(Mora et al., 2013)
	SHV-R2	CCC GGCGATTGCTGATTCGC				
<i>blaCTX-M</i> ¹	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	1	542	55	(Mora et al., 2013)
	CTX-C4	ACCGGATATCGTTGGTGGTGCC				
<i>mcr-1</i>	CLR5-F	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	0,5	309	57	(Liu et al., 2016)
	CLR5-R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG				
<i>cat</i> ¹	catA1-F1	TTCTTGCCCGCCTGATGAAT	1	200	55	Este estudio
	catA1-R1	ACCGTAACACGCCACATCTT				

Tabla 10. Continuación.

Diana	Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Volumen (μL)	Producto PCR (pb)	Tª (°C) anillamiento	Referencia
Virulencia						
<i>chuA</i>	ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	1	288	58	(Clermont et al., 2013)
	ChuA.2b	TGCCGCCAGTACCAAAGACA				(Clermont et al., 2000)
<i>hlyF</i>	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTTCAA	0,5	444	60	(Morales et al., 2004)
	Reverse	TTTGGCGGTTTAGGCATTCC				
<i>hlyA</i>	<i>hly f</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	0,3	1177	64	(Yamamoto et al., 1995)
	<i>hly r</i>	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA				
<i>tsh</i>	<i>tsh03</i>	GGTGGTGCCTGGAGTGG	0,5	640	62	(Dozois et al., 2000)
	<i>tsh15</i>	AGTCCAGCGTGATAGTGG				
<i>iroN</i>	<i>Ironec-f</i>	AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG	0,3	685	66	(J. R. Johnson et al., 2000)
	<i>Ironec-r</i>	GACGCCGACATTAAGACGCAG				
<i>iucD</i>	<i>Aer f</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	0,5	602	64	(Yamamoto et al., 1995)
	<i>Aer r</i>	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG				
<i>iutA</i>	<i>Aer-851f</i>	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	0,5	301	64	(J. R. Johnson et al., 1997)
	<i>Aer-1152r</i>	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG				
<i>vat</i>	<i>vat-F</i>	TCAGGACACGTTACGGCATTACGT	0,5	1100	66	(Spurbeck et al., 2012)
	<i>vat-R</i>	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT				
<i>fyuA</i>	Forward	GTAACAATCTTCCCCTCGGCAT	0,5	850	66	(Spurbeck et al., 2012)
	Reverse	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA				
<i>yfcV</i>	Forward	ACATGGAGACCACGTTACCC	0,5	292	66	(Spurbeck et al., 2012)
	Reverse	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG				

Los genes que llevan el superíndice 1 son aquellos cuyos cebadores estaban a una concentración de 10 μM, el resto de *primers* estaban en una concentración de 20 μM.

Los cebadores que se pusieron a punto en este trabajo fueron los pertenecientes a los genes: *MOB_{H11}*, *MOB_{P3}*, *MOB_{P51}*, *MOB_{F12}*, *MOB_{Q12}*, *MOB_{P13}*, *IncFI_FIA*, *IncFI_FIB*, *IncFII* y *cat*.

Anexo III

Tabla 11. UFC/mL media de la cepa LREC 158 a lo largo de 8 horas.

Tiempo (h)	UFC/mL	log(UFC/mL)
2	1280000	6,11
3	2190000	6,34
4	2270000	6,36
5	66000000	7,82
6	5600000000	9,75
7	13000000000	10,11
8	480000000	8,68

UFC/mL, Unidades formadoras de colonias/mililitro. La figura 1 es una representación gráfica de los datos que figuran en esta tabla.