

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos
genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en
enterobacterias**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Tania Isabel Garçao Curiao

Directores

María Teresa Coque González
Rafael Cantón Moreno

Madrid, 2014

Copyright © 2013 Tânia Isabel Garção Curião
Todos los derechos reservados.

Ilustración de la portada por Sofia Curião Oliveira y David Curião Oliveira.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología II



**Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los
elementos genéticos asociados a resistencia a
antibióticos y biocidas en Enterobacterias**

Tânia Isabel Garção Curião

Hospital Universitario Ramón y Cajal - Servicio de Microbiología
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)



Comunidad de Madrid



MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD



Instituto de Salud Carlos III

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología II



**Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los
elementos genéticos asociados a resistencia a
antibióticos y biocidas en Enterobacterias**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

Tânia Isabel Garção Curião

VºBº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Dra. María Teresa Coque González

Dr. Rafael Cantón Moreno



Madrid, 2013

Memoria presentada en la Facultad de Farmacia
de la Universidad Complutense de Madrid por
Doña Tânia Isabel Garção Curião
para optar al grado de Doctor en Microbiología

Tutores

Dra. Teresa M. Coque

Investigadora Senior en el Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias. Unidad asociada de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dr. Rafael Cantón

Jefe del Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias. Unidad asociada de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en Enterobacterias

El trabajo de esta tesis fue financiado por:

- Instituto de Salud Carlos III- ISCIII Ministerio de Economía y Competitividad- Gobierno de España. *Ayuda Predoctoral de Formación en Investigación en Salud* (PFIS- FI09/00901) a Tânia Curião, Octubre 2009- Septiembre 2013
- Séptimo Programa Marco de la Unión Europea - BIOHYPO “*Confronting the clinical relevance of biocide induced antibiotic resistance*” (FP7-KBBE-2008-2B; 227258), Octubre 2009-Marzo 2013



BIOHYPO



Instituto de Salud Carlos III

Ao Luis, sempre presente
Aos meus pais e mana
Aos meus pequenos artistas, David e Sofia

Agradecimientos

Ya queda lejos aquel día en el que decidí emprender esta aventura. Tenía muchas ganas e ilusión, y gracias al respaldo y contribución de muchas personas, he podido llegar hasta aquí. Quiero expresar las gracias a todas aquellas personas que directa o indirectamente han dejado su huella en este trabajo, y sin las cuales, este camino no se hubiese sido igual.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Teresa Coque y el Dr. Rafael Cantón, por haberme otorgado la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación, por su confianza, amistad y consideración. A la Dra. Teresa Coque quiero agradecerle especialmente su sensibilidad hacia los problemas, su optimismo ante los desafíos, y su empeño, dedicación y perfeccionismo en los proyectos. Siempre te has preocupado para que alcanzase lo mejor de mí misma, tanto en mis competencias humanas como profesionales. Hemos vivido muchas experiencias juntas, gracias. Quiero expresar mi gratitud al Dr. Rafael Cantón por haberme animado a volver a Madrid para realizar mi carrera científica. Durante todos estos años he disfrutado tu cercanía, tu sentido del humor y amistad. Siempre dedicado y atento. Gracias a ambos se han inculcado en mí valores importantes para un buen desempeño profesional, y para la vida.

Al Dr. Fernando Baquero por su sonrisa, su interés, perspicacia científica, intelectualidad y pasión por la Microbiología.

Al Dr. Claudio Pérez Díaz, con quien tuve el placer de entablar una estrecha relación personal y profesional, por su gran disposición a ayudar y resolver problemas.

Al Dr. José Luis Martínez, que me recibió con gran hospitalidad en su laboratorio. Durante mi estancia en el CNB tuve la suerte de aprender mucho de él, y ha sido un pilar imprescindible en lo referente a biocidas.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por todos los momentos vividos, y por su aportación en esta empresa. A Angela, con quien mi relación traspasó las fronteras del laboratorio, quisiera agradecerle su ayuda para integrarme en un país extranjero, su disponibilidad, su amistad y su forma de ser. A Arancha por su cercanía y disposición en ayudar en lo que fuera. A Aida por su amistad, por los buenos momentos pasados dentro y fuera del laboratorio, por su complicidad, confianza y comprensión. A Manu por ser un buen amigo, el mejor de los anfitriones, y todas las risas que nos hemos echado juntos. A Ana Sofía, por los buenos momentos vividos en los primeros años, las

confidencias, y el buen humor. Quisiera también agradecer por la fructífera convivencia, su ayuda, y disponibilidad durante este tiempo a: María, Carmen, Patricia, Marta, Elia, Ana Moreno, Ana Raquel, Conchi, Desirée y los estudiantes y residentes que han rotado en el laboratorio. Además, en la fase final, también quiero agradecer la amistad, cercanía, y afecto de Ricardo y Antonio.

A Marisa Morosini, Juan Carlos, Rosa del Campo, Merche, Isabel, Elena del servicio de microbiología, quienes siempre se mostraron disponibles para ayudarme y por su simpatía.

A mis compañeros del CNB que me acogieron con calidez durante mi estancia, Alejandra, Fernando “Tuenti”, Felipe, Blanca, Jorge, Carolina y Guillermo por su aprecio, ayuda, cercanía y buenos momentos.

A mis amigas Silvia, Daniela, Susana, Paula y Sofia por el ánimo y aprecio transmitidos durante estos años.

Uno de los grandes soportes en este viaje ha sido Luis, por sus aportaciones positivas, su paciencia y generosidad, por su escucha activa, por su apoyo infinito, y sus sabios consejos, por su cariño y amor, por su comprensión y estímulo incondicional hasta hoy. De él aprendí el valor de las relaciones interpersonales que me ayudaron en el manejo de muchas situaciones y que me hicieron cambiar de paradigma. A mi familia madrileña, a Ana, José Eugenio, Javier, M^a Teresa, Eugenio, Irene, Teresa y Pablo y en especial a María, por haberme recibido y cuidado tanto, por su constante apoyo y cariño.

A mi familia, padres, hermana, mis sobrinos David y Sofía, y Artur que me han apoyado siempre. Les agradezco toda la fuerza que me transmitían, su paciencia, cariño y confianza que depositaron en mí en la distancia. A David y Sofía, les agradezco su ilusión de niños, que da energía e inspira. Por vuestro amor cuando vuelvo a casa.

A todas las personas con las que me he cruzado en el camino formando una parte de mí. Gracias.

Índice

Abstract	1
Resumen	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Antibióticos y Biocidas	7
1.2. Antibióticos. Clasificación y mecanismos de acción	7
1.3. Biocidas. Clasificación y mecanismos de acción.....	10
1.4. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....	13
1.4.1. Resistencia a antibióticos (sulfonamidas, aminoglicósidos y β -lactámicos	14
1.4.2. Resistencia a biocidas	19
1.4.2.1. Bombas de eflujo	20
1.4.3. Tolerancia a biocidas.....	25
1.4.3.1. Estudios de determinación de la sensibilidad a biocidas	25
1.4.3.2. Estudios <i>in vitro</i> de desarrollo de tolerancia a biocidas y antibióticos	27
1.4.4. Resistencia fenotípica y resistoma intrínseco	28
1.5. Ecología de las unidades de selección de resistencia a antimicrobianos	29
1.5.1. Consorcios bacterianos.....	30
1.5.2. Plásmidos	32
1.5.3. Transposones	34
1.5.4. Integrones de clase 1.....	36
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	
2.1. Hipótesis de trabajo y Objetivos	41
CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Materiales	45
3.1.1. Medios de cultivo	45
3.1.2. Reactivos	45
3.1.3. Soluciones	47
3.1.4. Enzimas de restricción	48
3.1.5. Marcadores de peso molecular	48
3.1.6. Vectores de clonación.....	48
3.1.7. Cepas receptoras y de referencia	48
3.1.8. Kits comerciales.....	49
3.2. Aislados bacterianos estudiados.....	49
3.3. Identificación bacteriana	51

3.4.	Sensibilidad a antimicrobianos (Biocidas y antibióticos).....	52
3.4.1.	Antibióticos y biocidas	52
3.4.2.	Técnicas utilizadas	53
3.4.3.	Determinación de la actividad de bombas de eflujo	56
3.5.	Crecimiento bacteriano y coste biológico	56
3.5.1.	Cinética de crecimiento bacteriano basada en la medición de la densidad óptica	57
3.5.2.	Cinética de crecimiento bacteriano basada en la medición de la respiración celular- Microarrays fenotípicos (Biolog)	58
3.6.	Selección de mutantes a biocidas y/o antibióticos	59
3.6.1.	Generación de mutantes	59
3.6.2.	Caracterización de los fenotipos de mutantes a antimicrobianos: Microarrays fenotípicos (Biolog).....	60
3.6.3.	Análisis de mutaciones en <i>fabI</i>	61
3.7.	Técnicas moleculares de manipulación de ácidos nucleicos: ADN y ARN	61
3.7.1.	Extracción de ADN genómico, ADN plasmídico y ARN	61
3.7.2.	Amplificación de ADN	64
3.7.2.1.	PCR en tiempo real cuantitativa para análisis de expresión génica	65
3.7.3.	Separación y purificación de ADN.....	67
3.7.4.	Purificación y secuenciación de ADN (de amplicones, clonajes y plásmidos).....	69
3.7.5.	Localización de genes en el ADN genómico	70
3.7.6.	Clonación de genes en vectores de expresión	71
3.8.	Expresión génica	73
3.8.1.	Retrotranscripción	73
3.8.2.	RT-PCR cuantitativa	74
3.8.3.	Microarrays.....	74
3.9.	Estructura poblacional	75
3.9.1.	Electroforesis de campo pulsado (ECP)	75
3.9.2.	MultiLocus Sequence Typing (MLST)	75
3.9.3.	Grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	78
3.10.	Estudios de transferibilidad de genes de resistencia	79
3.10.1.	Conjugación en medio sólido o líquido.....	79
3.11.	Caracterización de Elementos de Transmisión Horizontal (ETH)	80
3.11.1.	Caracterización plasmídica	80
3.11.2.	Determinación del número y tamaño	80

3.11.2.1. Análisis del perfil plasmídico	80
3.11.2.2. Determinación de los grupos de incompatibilidad.....	81
3.11.3. Caracterización de integrones	83
3.11.4. Análisis de las secuencias flanqueantes del gen <i>sul2</i>	84
3.12. Análisis bioinformático de secuencias.....	87
3.12.1. Tratamiento y caracterización de secuencias nucleotídicas y proteicas de genes y otros elementos genéticos	87
3.12.2. Análisis filogenético de la diversidad de genes <i>qac</i>	88
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Análisis fenotípico, genotípico y bioinformático de genes de resistencia a sulfonamidas (sul) y sales de amonio cuaternario (qac). Caracterización de elementos de transferencia horizontal (ETH) endemo-epidémicos asociados a resistencia a sulfonamidas.....	93
4.1.1. Epidemiología de la resistencia a sulfonamidas.....	94
4.1.2. Diversidad clonal	95
4.1.3. Fenotipo de sensibilidad a sulfonamidas de los genes <i>sul</i>	96
4.1.4. Caracterización de las plataformas genéticas asociadas a los genes <i>sul2</i> y <i>sul3</i>	97
4.1.4.1. Contexto genético del gen <i>sul2</i>	98
4.1.4.1.1. Análisis de los plásmidos pHRYC200 (IncQ, <i>sul2</i>) y pHRYC201 (IncFII)	99
4.1.4.2. Contexto genético del gen <i>sul3</i>	104
4.1.4. Contexto genético de <i>qacI</i>	111
4.1.5. Análisis fenotípico y genotípico de genes asociados con resistencia a sales de amonio cuaternario (QAC).	113
4.1.5.1. Fenotipo de los genes <i>qac</i>	113
4.1.5.2. Filogenia de genes <i>qac</i>	115
4.1.6. Discusión	122
4.2. Actividad de biocidas de uso frecuente.....	129
4.2.1. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), bactericidas (CMB) y puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs)	130
4.2.2. Sensibilidad de biocidas en <i>E. coli</i>	137
4.2.3. Relación con la sensibilidad a antibióticos	139
4.2.4. Discusión	141
4.3. Influencia de la exposición previa a biocidas y antibióticos sobre la sensibilidad de Enterobacterias a estos compuestos: Estudio fenotípico y genotípico de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Salmonella enterica</i> tolerantes a biocidas.....	145

4.3.1. Obtención y caracterización de mutantes con sensibilidad alterada a biocidas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Salmonella enterica</i>)	146
4.3.2. Análisis de fenotipos de sensibilidad a antimicrobianos utilizando microarrays fenotípicos (Biolog PM11 y PM20)	151
4.3.3. Análisis metabólico para los mutantes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Biolog PM1 y PM2)	155
4.3.4. Crecimiento, coste biológico y expresión génica (RT-PCR) de mutantes con alteración de sensibilidad a biocidas.....	159
4.3.5. Diversidad de <i>fabI</i>	162
4.3.6. Transcriptómica en aislados con sensibilidad disminuida a biocidas.....	164
4.3.6.1. Alteraciones comunes en el transcriptoma de mutantes resistentes a biocidas seleccionados de <i>S. enterica</i> SL1344.....	164
4.3.6.2. Análisis transcriptómico de aislados naturales de <i>Salmonella</i>	166
4.3.7. Discusión	175
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	185
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA	189
CAPÍTULO 7. ANEXOS	
7.1. Abreviaturas	217
7.2. Mapa genético del vector de clonaje pBGS18.....	218
7.3. Publicaciones	219

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos.	9
Tabla 2. Clasificación, mecanismo(s) de acción y aplicaciones de biocidas.	12
Tabla 3. Características genéticas de los genes adquiridos de resistencia a sulfonamidas.	17
Tabla 4. Principales mecanismos de resistencia en Enterobacterias a los biocidas estudiados.	20
Tabla 5. Soluciones de biocidas y antibióticos.	45
Tabla 6. Antibióticos testados por difusión en disco o en gradiente.	46
Tabla 7. Cepas de referencia.	49
Tabla 8. Kits comerciales.	49
Tabla 9. Especies bacterianas estudiadas y presencia de BLEE.....	50
Tabla 10. Características epidemiológicas y de sensibilidad de los aislados bacterianos usados para la obtención de mutantes a biocidas.	51
Tabla 11. Valores de CMI y CMB en mg/L de las cepas de referencia.....	55
Tabla 12. Concentraciones de biocidas y/o antibióticos en mg/L, utilizados en la selección de mutantes.	60

Tabla 13. Cebadores usados en la qRT-PCR.	67
Tabla 14. Cebadores y condiciones utilizados para amplificar los diferentes genes <i>qac</i> y <i>sul</i>	72
Tabla 15. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de aislados de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> por MLST.	76
Tabla 16. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los grupos filogenéticos de los aislados de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> productores de BLEE.	79
Tabla 17. Caracterización de plásmidos de <i>Enterobacteriaceae</i> basada en la identificación del grupo de incompatibilidad utilizando un esquema de múltiples reacciones de PCR (PBRT).	82
Tabla 18. Cebadores utilizados para la caracterización de plásmidos tipo Inc11.	82
Tabla 19. Cebadores utilizados para la caracterización de elementos portadores de genes <i>sul</i>	85
Tabla 20. Fenotipo de sensibilidad a sulfonamidas conferido por los genes <i>sul</i>	97
Tabla 21. Datos epidemiológicos de los aislados de <i>E. coli</i> portadores de integrones con <i>sul3</i>	107
Tabla 22. Integrones de clase 1 con <i>qacI</i> disponibles en las bases de datos.	112
Tabla 23. Análisis del fenotipo a biocidas conferido por los genes <i>qac</i>	114
Tabla 24. Características epidemiológicas de los genes descritos y sus variantes.	118
Tabla 25. Distribución de los valores de CMIs, CMBs y puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) a biocidas para las especies de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcaceae</i> , <i>Listeriaceae</i> y <i>Enterococcaceae</i>	132
Tabla 26. Fenotipos de mutantes obtenidos <i>in vitro</i> con sensibilidad disminuida a biocidas.	149
Tabla 27. Mutantes analizados por microarrays fenotípicos (Biolog PM11-20).	151
Tabla 28. Principales cambios de sensibilidad a compuestos antimicrobianos para los mutantes a biocidas (Biolog PM11-20).	154
Tabla 29. Perfiles metabólicos de los mutantes de <i>E. coli</i> (Biolog PM1 y 2).	156
Tabla 30. Perfiles metabólicos de los mutantes de <i>K. pneumoniae</i> (Biolog PM1 y 2).	157
Tabla 31. Cambios aminoacídicos en FabI para mutantes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> con sensibilidad alterada a triclosan respecto a sus correspondientes cepas parentales.	163
Tabla 32. Categorías de genes con expresión diferencial para los aislados de <i>Salmonella</i> con sensibilidad alterada a biocidas (mutantes y cepas naturales).	168
Tabla 33. Perfiles de expresión génica de mutantes de <i>Salmonella</i>	169
Tabla 34. Perfiles de expresión génica de aislados naturales de <i>Salmonella</i>	172

Índice de Figuras

Figura 1. Cronología de la introducción de las distintas familias de antibióticos.	15
Figura 2. Familias de bombas de eflujo.	21
Figura 3. Representación gráfica de la distribución de CMIs a un antibiótico en poblaciones bacterianas de una especie. Identificación de puntos de corte epidemiológicos (ECOFF).	26
Figura 4. Interacción de los antibióticos sobre las diferentes unidades de selección de un microbioma.	30
Figura 5. Representación gráfica del plásmido IncQ pRSF1010.	34

Figura 6. Representación gráfica de un integrón de clase 1.	37
Figura 7. Metodología empleada para la selección de tolerantes a biocidas y/o antibióticos.	59
Figura 8. Amplificación y digestión enzimática de genes housekeeping utilizados en la determinación de los grupos filogenéticos de <i>K. pneumoniae</i>	78
Figura 9. Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de integrones de clase 1 derivados de Tn21.	83
Figura 10. Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de los elementos genéticos asociados a <i>sul2</i>	84
Figura 11. Análisis temporal de la resistencia a sulfonamidas, trimetoprim, estreptomicina y tetraciclina en aislados de Enterobacterias, productoras y no-productoras de BLEE del hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2006).	94
Figura 12. Distribución de los genes <i>sul</i> en aislados productores y no productores de BLEE (TEM, SHV, CTX-M), VIM-1 y OXA-30.	95
Figura 13. Distribución de los genes <i>sul</i> en diferentes grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	96
Figura 14. Frecuencia de los genes <i>sul</i> y su asociación con la sensibilidad a sulfonamidas.	97
Figura 15. Análisis genotípico y bioinformático de las plataformas genéticas asociadas al gen <i>sul2</i> , identificadas en este estudio.	99
Figura 16. Otras plataformas genéticas con ISCR2(Δ) asociadas al gen <i>sul2</i> descritas en la bibliografía.	99
Figura 17. Representación gráfica del plásmido movilizable pHRYC200 con el gen <i>sul2</i>	101
Figura 18. Diagrama representativo del plásmido pHRYC_201 por contigs.	103
Figura 19. Integrones con <i>sul3</i> y <i>qacI</i> identificados.	105
Figura 20. Perfiles de huella dactilar de la digestión enzimática con <i>PstI</i> de plásmidos IncI1 (\approx 100 kb) portadores de <i>sul3</i> y <i>bla</i> _{SHV-12}	109
Figura 21. Diversidad de integrones con <i>sul3</i> basada en estudios publicados y secuencias depositadas en la base de datos GenBank.	110
Figura 22. Ensayo de actividad de bombas de eflujo: acumulación de bromuro de etidio en presencia o no del inhibidor de bombas de protones CCCP para transformantes de <i>E. coli</i> KZM120 portadores de pBGS18:: <i>qacE</i> , pBGS18:: <i>qacK</i> , o pBGS18:: <i>qacI</i> en relación a la cepa control <i>E. coli</i> KZM120::pBGS18.	115
Figura 23. Análisis filogenético de genes <i>qac</i> de Proteobacteria.	116
Figura 24. Alineamiento de las secuencias <i>attC</i> de los genes <i>qac</i> prototipo.	117
Figura 25. Distribuciones de los valores de CMI y CMBs al triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina e hipoclorito de sodio para diferentes especies de gramnegativos y grampositivos.	136
Figura 26. Distribuciones de CMI al triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina e hipoclorito de sodio según los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	138
Figura 27. Distribuciones de CMI a biocidas en función de la sensibilidad antibiótica a ciprofloxacino y β -lactámicos de tercera generación (cepas con BLEE).	140

Figura 28. Perfil de campo pulsado del ADN cromosómico de las cepas salvajes y sus respectivos mutantes a biocidas, tras digestión enzimática.	159
Figura 29. Curvas de crecimiento de diferentes mutantes a biocidas/antibióticos de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. enterica</i> obtenidas en medio LB con agitación, a 37°C.	161
Figura 30. Expresión génica diferencial de los diferentes componentes de bombas AcrAB y reguladores globales para mutantes a biocidas de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> y <i>S. enterica</i>	162
Figura 31. Mapa genético representativo del vector pBGS18 usado en los experimentos de clonación.	218

ABSTRACT

Antibiotics and biocides are widely used for many purposes in daily life, in general for inhibiting or killing potentially pathogenic bacteria and they differ from each other in different aspects, including the spectrum of activity, the mechanism of action and the applications. First, antibiotics are mostly used as therapeutical agents or growth promoters, while biocides are used as antiseptics, disinfectants, preservatives and detergents. Second, most biocides do not act on a specific cell target and mechanisms responsible for their reduced susceptibility are poorly characterized in contrast to those associated with antibiotics. Most works on this topic have been performed using laboratory-generated mutants and have allowed to establish that the over-expression of efflux pumps AcrAB or AcrEF, which are controlled by global transcriptional regulators such as *marAB*, *ramA* and *soxRS*, constitutes the main cause of biocide tolerance and confers diverse low-level antibiotic resistance phenotypes. Adaptation to biocides may impair cellular homeostasis, increase the activity of efflux pumps, or change expression of proteins regulating invasiveness, virulence or stress response. Whether or not all of these changes are needed for adaptation to the presence of biocides or they just reflect fitness changes associated with such adaptation remains to be established. Finally, bacterial susceptibility based on either the likelihood of treatment failure (clinical breakpoints) or the upper limit of tolerance in the wild-type population (epidemiological cut-off value, ECOFF), are clearly defined for most antibiotics and species but fully unexplored for biocides.

Resistance to antimicrobials is nowadays an outstanding problem in Public Health, because of the scarce options to treat and/or prevent infections caused by multiresistant pathogens. Since both antibiotics and biocides are widely used, often in combination, a potential risk to develop cross-resistance is of concern. Here, we focused on the association of reduced susceptibility to both antibiotics and biocides among *Enterobacteriaceae*, a bacterial family of opportunistic pathogens of humans and animals, and thus, very exposed to these two groups of antimicrobials. We especially analysed the link between sulphonamides and biocide resistance because the widespread of platforms containing genes putatively coding for resistance to such compounds since early 30's in both hospital and community settings.

The main objective of this Thesis is to evaluate the influence of biocide resistance on the emergence and spread of antibiotic resistance. To achieve this goal three specific objectives were planned, namely i) to determine the largely unexplored susceptibility of main opportunistic pathogens against biocides widely used in the nosocomial and community settings (triclosan, TRI; benzalkonium chloride, BKC; chlorhexidine, CHX and sodium hypochlorite, NaOCl), ii) to evaluate the effect of exposure to the mentioned biocides, or antibiotics (ampicillin, AMP; ceftazidime, CAZ and ciprofloxacin, CIP) on the selection of antibiotic/biocide-tolerance in enterobacterial; isolates and iii) to analyse at genotypic, phenotypic and bioinformatics levels the known transferable elements

conferring resistance to both antibiotics (sulphonamides, *sul* genes) and biocides (BKC, *qac* genes) and its role on the selection, and persistence of certain genetic elements involved in the spread of resistance to antibiotics more recently introduced in the therapeutic arsenal. Classical microbiology (bacterial identification, determination of susceptibility to antibiotic and biocides, analysis of growth and fitness) and molecular biology techniques (qRT-PCR, pulsed-field-gel-electrophoresis, multilocus sequence typing, cloning, sequencing), computational sequence analysis, as well as high-throughput technologies such as phenotype and expression microarrays and plasmid sequencing were used.

The unimodal MIC/MBC distributions for the four biocides studied indicate that biocide resistant isolates among natural populations are scarce and this implies that co-selection or cross selection of antibiotic resistance would also be a rare event in such populations. Experiments of exposure of diverse *Enterobacteriaceae* to antibiotics and/or biocides altered the expression of AcrAB components and global regulators, which may result in an alteration of metabolic pathways (e.g. ABC transport systems as phosphotransferase system-PTS or some related to sugars or aminoacids). Furthermore, mutants exhibiting remarkable change in antibiotic susceptibility showed high fitness cost and increased expression of *marA* or *ramA* but not in the expression of AcrAB-TolC, the main mechanism of biocide resistance in *Enterobacteriaceae*. In addition, we observed that reduced susceptibility to biocides was associated with high levels of expression of genes codifying for the efflux pump SugE, protein synthesis, metabolic, membrane permeability, stress and virulence for both mutants and natural isolates of *Salmonella enterica*. Moreover, gene expression results highlight the wide range of multiple pathways employed by *Enterobacteriaceae* to counteract biocides and achieve stasis/stress survival.

Finally, the genetic characterization and population analysis of transferable genetic elements encoding resistance to antibiotic (*sul*) and biocides (*qac*) allowed to identify different events of capture, selection and persistence. Either the elements that contain *sul2* (platforms associated with pRSF1010-like or ISCR2) or *sul3* (class 1 integrons with unusual 3'CS) are located on a diversity of plasmids. Interplasmid recombination, often mediated by insertion sequences, seems have facilitated the acquisition of adaptative genes and the selection and persistence of enterobacterial populations. The phenotypic analysis of *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*) and *qac* (*qacE*, *qacF*, *qacG*, *qacI*, *qacK*) genes cloned in an isogenic *E. coli* K12 clonal background showed that *sul1*, *qacE*, *qacI* and *qacK*, traditionally considered as resistance genes, do not decrease the susceptibility to sulphonamides or BKC, respectively.

RESUMEN

Antibióticos y biocidas son compuestos ampliamente utilizados desde hace más de 50 años para inhibir o eliminar el crecimiento microbiano y se diferencian fundamentalmente en el espectro, mecanismo de acción y aplicaciones. Los antibióticos se emplean en el tratamiento de infecciones bacterianas, además de ser usados como profilácticos o promotores de crecimiento. Los biocidas se utilizan como antisépticos, conservantes o desinfectantes para controlar el crecimiento y proliferación de diferentes microorganismos (bacterias, hongos, virus) en el entorno hospitalario, doméstico, veterinario o industrial. El riesgo de corresponsencia y/o resistencia cruzada a ambos compuestos constituye un problema de Salud Pública de primer orden.

Los objetivos de esta tesis son: i) determinar la sensibilidad a biocidas ampliamente usados en el entorno hospitalario y comunitario (triclosan, TRI; cloruro de benzalconio, BKC; clorhexidina, CHX; hipoclorito de sodio, NaOCl) en los principales patógenos oportunistas de animales y humanos, ii) evaluar la aparición de resistencia a los biocidas y antibióticos tras exposición a estos dos grupos de compuestos, iii) analizar genotípica, fenotípica, y poblacionalmente los elementos genéticos transferibles descritos que confieren resistencia a biocidas (bombas de eflujo SMR que confieren resistencia a BKC, *qac*) y antibióticos (sulfamidas, genes *sul*).

El análisis de la sensibilidad de una colección de aislados habitualmente patógenos oportunistas (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.) a los biocidas TRI, CHX, BKC y NaOCl reveló una baja prevalencia de microorganismos tolerantes a estos compuestos. Sin embargo, los estudios de exposición *in vitro* a biocidas y/o antibióticos de diferentes enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*) permitieron identificar una diversidad de fenotipos de sensibilidad reducida (e.g. TRI^R, BKC^R, TRI^R/BKC^R, TRI^R/BKC^R/CHX^R), sensibilidad aumentada (e.g. TRI^{HS}, TRI^{HS}/BKC^{HS}, TRI^{HS}/CHX^{HS}) y combinaciones de ambas a diferentes biocidas (TRI^{HS}/BKC^R/CHX^R, TRI^R/CHX^{HS}) y antibióticos que podrían reflejar la existencia de rutas compensatorias. Los mutantes con marcada reducción de sensibilidad presentaron un coste biológico elevado y sobreexpresaron los reguladores globales (*marA* o *ramA*). El metabolismo de fuentes de carbono y nitrógeno de estos mutantes sufrió alteraciones relacionadas con mayor patogenicidad en el caso de *E. coli*. El análisis transcriptómico de aislados y mutantes de *S. enterica* con sensibilidad disminuida a biocidas reveló un aumento de expresión de diversos genes implicados en la síntesis proteica, metabolismo, membrana, estrés y virulencia, indicando que la respuesta bacteriana a los biocidas es multifactorial.

Finalmente, los estudios de caracterización genética y análisis poblacional de los elementos genéticos transferibles portadores de genes de resistencia a antibióticos (*sul*) y biocidas (*qac*) pusieron de manifiesto diferentes eventos de captura, selección y dispersión. Tanto los elementos que contienen *sul2* (plataformas derivadas de plásmidos IncQ y asociadas a ISCR2) como *sul3* y *qacI* (integrones inusuales de clase 1) se encuentran en un número limitado de transposones localizados en una variedad de plásmidos conjugativos de *Enterobacteriaceae* de origen clínico y comunitario.

La recombinación interplasmídica mediada por secuencias de inserción parece haber facilitado la adquisición de genes adaptativos y la selección y persistencia de clones de enterobacterias. El análisis fenotípico de genes *sul* (*sul1*, *sul2*, *sul3*) y *qac* (*qacE*, *qacI*, *qacK*), realizado por clonación de estos genes en un contexto isogénico de *E. coli* K12 reveló que *sul1*, *qacE*, *qacI* o *qacK*, considerados tradicionalmente como genes de resistencia no conferían disminución de sensibilidad. El análisis filogenético de genes *qac* demostró la evolución de estos genes por selección purificadora.

(Incluido en la base de datos de Tesis Doctorales Teseo)

Introducción

1.1. ANTIBIÓTICOS Y BIOCIDAS

El concepto de antibiosis se utilizó por primera vez en 1889 para describir el efecto antagonista que presentaban unos microorganismos sobre el crecimiento de otros (1). Este término se aplicó posteriormente a diversos compuestos con capacidad para inhibir o eliminar el crecimiento microbiano, que difieren en espectro, mecanismo de acción y aplicación. Antibióticos y biocidas son los compuestos con acción antibiótica más ampliamente utilizados (2,3).

Los antibióticos fueron introducidos en el arsenal terapéutico en 1941 para el tratamiento y profilaxis de infecciones bacterianas en humanos y animales y desde 1946 se utilizaron como promotores del crecimiento en la agricultura (4). Los antibióticos son sustancias orgánicas naturales o sintéticas que inhiben el crecimiento bacteriano. Además de su función defensiva, participan en la señalización y homeostasis de las comunidades bacterianas pudiendo modificar el crecimiento bacteriano, la virulencia, la esporulación, la movilidad, la mutagénesis, la respuesta al estrés, la inducción de fagos, la transformación, la transferencia lateral génica, la recombinación o la formación de biofilms (5-9).

Los biocidas son compuestos naturales (10) o sintéticos que se utilizan en desinfección, antisepsia, conservación y/o como detergentes para controlar el crecimiento y proliferación de diferentes microorganismos (bacterias, hongos, virus) en el entorno hospitalario, doméstico, veterinario o industrial, desde hace décadas (11). Entre sus múltiples aplicaciones se incluyen la desinfección de agua, material quirúrgico, superficies, productos de higiene personal (lavado y desinfección de piel, boca, soluciones de lentillas de contacto) y conservación de maderas y alimentos (12). Pueden estar impregnando dispositivos médicos y textiles, como ropa de cama y batas, o superficies como camas, paneles de pared, puertas y plásticos (2,13).

El riesgo de coexistencia y/o resistencia cruzada a ambos compuestos constituye un problema de Salud Pública de primer orden.

1.2. ANTIBIÓTICOS. CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Los antibióticos se pueden clasificar según su estructura química, su mecanismo o su espectro de acción (Tabla 1). De acuerdo a su mecanismo de acción, hay compuestos que actúan sobre la síntesis de la pared celular (e.g. β -lactámicos y glicopéptidos), la permeabilidad de la membrana celular (e.g. polimixinas y colistina), la

síntesis proteica (e.g. macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos, linezolid y cloranfenicol), la síntesis de los ácidos nucleicos (e.g. quinolonas y rifampicina), o rutas metabólicas (e.g. sulfonamidas u otros análogos del ácido fólico) (Tabla 1) (5,14). Según su espectro de acción, los antibióticos pueden ser de amplio o reducido espectro, en función de su actividad frente a bacterias grampositivas y/o gramnegativas. También se clasifican en bacteriostáticos o bactericidas según inhiban o impidan el crecimiento bacteriano.

Tabla 1. Clasificación y mecanismo de acción de antibióticos.

Familia química	Ejemplos de antibióticos	Mecanismos de acción
B-lactámicos (anillo B-lactámico)	Penicilina cefalosporinas carbapenems monobactams	Inhibición de la síntesis del peptidoglicano en el paso final de la transpeptidación
Glicopéptidos (péptidos de elevado peso molecular con azúcares ligados a aminoácidos)	Vancomicina, teicoplanina, daptomicina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana por unión al residuo D-Ala-Ala terminal impidiendo la transglicosilación y formación del peptidoglicano
Polimixinas (decapéptido cíclico catiónico unido a un ácido graso)	Polimixina B y colistina	Alteración de la permeabilidad de la membrana externa por fijación de la porción catiónica (polipéptido) a la porción aniónica (lipopolisacárido) de la membrana externa de gramnegativos
Quinolonas (derivados de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1)	Ácido nalidixico, norfloxacin, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino	Inhibición de la síntesis de ADN por acción sobre la ADN girasa o topoisomerasa IV
Rifamicinas (complejo macrocíclico)	Rifampicina	Inhibición de la síntesis de ARN por unión a la ARN polimerasa
Tetraciclinas (sustituciones de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno)	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, penimiliciclina	inhibición de la síntesis proteica debido a la unión reversible a la subunidad 30S ribosomal,
Aminoglicósidos (policaciones de dos o más aminoazúcares unidos a un anillo aminociclitol)	Estreptomina, gentamicina, ampicacina, tobramicina, netilmicina, neomicina	Inhibición de la síntesis proteica debido a la unión irreversible a la subunidad 30S ribosomal
Macrólidos (anillo macrocíclico de lactona con uno o más desoxiazúcares)	Eritromicina, claritromicina, azitromicina, telitromicina	inhibición de la síntesis proteica debido a la unión reversible a la subunidad 50S ribosomal
Anfenicoles (derivado del ácido dicloroacético con una fracción nitrobenzeno)	Cloranfenicol, tianfenicol	inhibición de la síntesis proteica debido a la unión reversible a la subunidad 50S ribosomal
Sulfonamidas (amidas de ácidos sulfónicos)	Sulfametoxazol, sulfadiazina	Inhibición de la ruta biosintética del ácido fólico por competición con la enzima dihidropteroato sintasa
Trimetoprim (derivado de pirimidina)	Trimetoprim, cotrimoxazol (en combinación con sulfametoxazol)	Inhibición de la ruta biosintética del ácido fólico por competición con la enzima dihidropteroato reductasa

1.3. BIOCIDAS. CLASIFICACIÓN Y MECANISMOS DE ACCIÓN

Los biocidas también se clasifican según su espectro y mecanismo de acción en “-estáticos”, si solo inhiben el crecimiento del microorganismo (bacteriostático, fungistático, esporostático), o “-cidas”, si lo eliminan (bactericida, fungicida, esporicida). Los mecanismos de acción de biocidas han sido poco explorados pero difieren de los de antibióticos en actuar frecuentemente sobre múltiples dianas y ser efectivos a altas concentraciones (2,15). Se aplican como antisépticos, desinfectantes, conservantes o detergentes en humanos y animales tanto a nivel clínico como industrial, ambiental o doméstico, dada su baja toxicidad.

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (“Centers for Disease Control and Prevention- CDC”), los *antisépticos* destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos en tejidos vivos (e.g. productos de lavado higiénico de manos). Los *desinfectantes* son similares a los antisépticos pero de utilización en objetos y superficies y se caracterizan por ser esporostáticos pero no necesariamente esporicidas. Los *conservantes* impiden la multiplicación de microorganismos empleados tanto en formulaciones farmacéuticas como en alimentos. Por último, los *detergentes* eliminan físicamente la materia contaminante de una superficie (16).

Los biocidas se pueden usar solos o en combinación, y su actividad depende del tipo de formulación, concentración, pH, periodo de contacto y de la presencia de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos que puedan interferir en su acción (16). Se clasifican en más de 22 categorías químicas que agrupan una gran variedad de compuestos (Tabla 2). Los cuatro biocidas analizados en esta tesis, triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina e hipoclorito de sodio, pertenecen a tres categorías químicas de compuestos ampliamente utilizados (Tabla 2) (2,13).

Los *biocidas catiónicos* pueden ser monocatiónicos, con un nitrógeno cuaternario asociado a un grupo hidrófobo [e.g. compuestos de amonio cuaternario (QACs) como cloruro de benzalconio (BKC), cetrimida]; bicatiónicos, con dos grupos catiónicos separados por un grupo hidrófobo puente [e.g. bisbiguanidas, clorhexidina (CHX) o alexidina]; o los polímeros policatiónicos con más de dos grupos catiónicos (e.g. biguanida polihexametileno PHMB). Los compuestos de amonio cuaternario actúan sobre la membrana celular desestabilizándola mediante el desplazamiento de cationes divalentes, y originando así lisis celular (17). En bacterias gramnegativas dañan también la membrana externa. Generalmente, la exposición a biocidas catiónicos provoca la

ruptura de la membrana y pérdida del contenido citoplasmático aunque la interacción con las proteínas de membrana y la capa lipídica depende del compuesto (18). La clorhexidina es un agente bactericida ampliamente utilizado en productos de higiene oral y de manos. La alexidina, difiere químicamente de la clorhexidina en la presencia de grupos etilxil terminales y es capaz de producir una alteración significativamente más rápida en la permeabilidad de la membrana.

Los **compuestos fenólicos** incluyen el fenol y el cresol que actualmente son poco usados, mientras los *bisfenoles*, que contienen dos anillos fenólicos como el triclosan (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenileter), son ampliamente utilizados como antimicrobianos de amplio espectro y pesticidas. El triclosan, entre otras acciones, inhibe una proteína participante en la biosíntesis de ácidos grasos - la proteína transportadora de enoil acil reductasa (FabI) (19-21). Se desconoce su modo de actuación específico, aunque se sabe que sus primeros efectos ocurren a nivel del citoplasma. Estudios en *E. coli* preconizaron que a concentraciones subinhibitorias, el triclosan inhibe la absorción de nutrientes esenciales, mientras que a concentraciones bactericidas se liberan componentes celulares y la célula muere (22,23). Se usa en formulaciones de higiene oral o de la piel, y más recientemente, su aplicación se ha extendido a productos de consumo como recipientes de plástico, tablas de cocina de cortar, champús, desodorantes, detergentes y ropa (18).

Los **agentes liberadores de cloro** incluyen el hipoclorito de sodio, el dióxido de cloro y los compuestos N-cloro (como el dicloroisocianuro), siendo el primero el más utilizado. Aunque estos compuestos sean agentes oxidantes y por ello destruyan las proteínas celulares, su mecanismo de acción es desconocido. Se ha descrito la formación de derivados clorados de las bases nucleotídicas, además de la alteración de la fosforilación oxidativa (24). A valores de pH bajos la oxidación se potencia. Las soluciones de hipoclorito de sodio son ampliamente usadas para la desinfección de superficies, el tratamiento de las aguas o la desinfección en casos de presencia de sangre.

Tabla 2. Clasificación, mecanismo(s) de acción y aplicaciones de biocidas.

Familia química	Biocida	Uso general	Mecanismo(s) de acción	Referencia
Alcoholes	Etanol Isopropanol	Antisépticos Desinfectantes Conservantes	Daño en la membrana y desnaturalización de proteínas	(25)
Aldehídos	Glutaraldeido Formaldeido	Desinfectantes esterilizantes conservantes	Unión a macromoléculas (proteínas, ADN, ARN)	(26)
Anilinas	Triclocarban	Antisépticos	Adsorción a la membrana citoplasmática con pérdida de la semipermeabilidad	(27)
Compuestos fenólicos	Bisfenoles: triclosan, hexaclorofeno Fenol Cresol	Antisépticos Conservantes Desinfectantes Conservantes	Inhibición de FabI, alteración de la membrana Pérdida membrana citoplasmática	(20)
Biocidas catiónicos: bisguanidas, compuestos de amonio cuaternario y otros	Clorhexidina, alexidina; bisguanidas poliméricas: polihexametileno	Antisépticos Conservantes desinfectantes	Daño de la membrana citoplasmática; inhibición de enzimas de la membrana, pérdida de los constituyentes celulares (altas concentraciones)	(17,18)
	Cloruro de benzalconio, cetilpiridinio, tetrafenilfosfonio, cetrimida	Desinfectantes Antisépticos Conservantes Detergentes Anticancerígeno Agentes intercalantes de ácidos nucleicos Antiséptico	Daño de la membrana citoplasmática; pérdida y coagulación de proteínas celulares	
	Bromuro de etidio; Acridina y derivados (acriflavina, proflavina)		Intercalante del ADN y ARN	
	Metil viológeno (paraquat)	Pesticida	Induce <i>soxSR</i> , origina superóxidos que reaccionan con la membrana lipídica celular	
Compuestos liberadores de halógenos	Cloro: hipoclorito de sodio Iodo	Desinfectantes Antisépticos Limpieza	Daño oxidativo (proteínas y ácidos nucleicos)	(28)
Peroxígenos	Peróxido hidrógeno Ácido peracético Ozono	Desinfectantes Esterilizantes	Oxidación de los grupos tiol enzimáticos	(24)
Derivados de metales pesados	Derivados de plata Derivados de mercurio	Conservantes Antisépticos Desinfectantes	Interacción con los grupos tiol de las enzimas unidas a membrana	(29)

Los efectos de los biocidas en la célula bacteriana pueden variar según la concentración del compuesto, su disponibilidad, el tiempo de exposición y la fisiología del microorganismo.

El uso de biocidas en Europa está legislado para garantizar un alto nivel de protección para humanos, animales y el medio ambiente (<http://ec.europa.eu/environment/biocides/>; Directiva 98/8/EC de 1998). En 2009 se creó un nuevo reglamento que evitaba las lagunas detectadas en la anterior Directiva y recientemente se ha dado relevancia a diferentes iniciativas de monitorización del desarrollo de resistencia a biocidas (proyecto europeo BIOHYPO FP7 KBBE-2008-2-4-02) (13,30).

1.4. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS

La resistencia a cada uno de los antibióticos de uso clínico o veterinario ha sido documentada poco después de su introducción en el arsenal terapéutico. En la actualidad, las tasas de microorganismos patógenos resistentes a diferentes agentes antimicrobianos son alarmantes y estos constituyen un problema de Salud Pública de primer orden (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>).

El gran consumo de antibióticos y biocidas en Biomedicina y Veterinaria y las cantidades de estos compuestos en el medio ambiente como consecuencia de diferentes actividades antropogénicas ha creado una gran presión selectiva que favorece la aparición, diseminación y persistencia de patógenos oportunistas resistentes a antibióticos y/o biocidas, siendo frecuente la documentación de resistencia cruzada a estos compuestos (13,31-36). Por este motivo, las medidas de prevención y control de la resistencia a agentes antimicrobianos deben plantearse de forma global en el ámbito clínico, veterinario y medio ambiental (9,32,37-41).

La resistencia bacteriana a antimicrobianos se divide de forma general en dos grandes categorías, *intrínseca* o *adquirida*. La resistencia intrínseca indica resistencia en todos o en la mayoría de aislados de una especie a un determinado compuesto. La resistencia adquirida resulta de mutaciones en el ADN existente o de la adquisición de ADN exógeno (por *transferencia*) (11,14,15,42-46).

Los mecanismos de resistencia intrínseca incluyen la:

- **Entrada reducida** (e.g. Impermeabilidad de la membrana externa de gramnegativos debida al lipopolisacárido- LPS y porinas- proteínas-canal no-específicas que permiten la difusión de sustratos hidrófilos) y/o **expulsión de sustratos** (bombas de eflujo constitutivas)
- **Inactivación enzimática** del compuesto codificada en el cromosoma

Los mecanismos de resistencia adquirida son:

- **Modificación de la diana** del antimicrobiano (e.g. β -lactámicos, tetraciclinas, glicopéptidos, trimetoprim, triclosan (47)).
- **Disminución de la acumulación:**
 - **Eflujo** activo (bombas tipo SMR implicadas en la resistencia a biocidas catiónicos y diferentes antibióticos que se diseminan en los genomas bacterianos gracias a su localización en elementos genéticos móviles) (48,49);
 - **Porinas** (implicadas en la difusión de antibióticos y biocidas)
 - **Enzimas inactivantes** (e.g. antibióticos β -lactámicos, cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina) o **modificantes** (e.g. aminoglicósidos) (16)
- **Duplicación de la diana**, siendo la copia menos sensible al compuesto (e.g. sulfonamidas y trimetoprim);
- **Sobreproducción de la diana** (e.g. trimetoprim y triclosan) (47,50)

Las alteraciones a nivel metabólico (véase apartado 1.4.4. (42,51) y los cambios fisiológicos (resistencia fenotípica; véase apartado 1.4.4.) (52-54) pueden dar lugar a resistencia a antimicrobianos (55).

Conocer el vínculo entre resistencia y otros procesos fisiológicos es esencial para predecir la evolución de la resistencia, determinar sus implicaciones clínicas y encontrar nuevas dianas de acción antimicrobiana (40,55).

1.4.1. Resistencia a antibióticos (sulfonamidas, aminoglicósidos y β -lactámicos)

Las sulfonamidas, β -lactámicos (penicilinas) y aminoglicósidos como estreptomycin y estreptotricina, fueron las primeras familias de antibióticos usadas para el tratamiento de infecciones en humanos y animales (Figura 1, (1,56,57). El primer compuesto utilizado como agente quimioterápico fue el prontosil en los años 1935-36,

usándose con posterioridad para el tratamiento de las infecciones durante la II guerra mundial (Figura 1). El prontosil es un profármaco que, *in vivo*, origina una sulfonamida, la cual al competir con el ácido p-aminobenzoico (PABA), sustrato de la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS), inhibe la ruta biosintética del ácido fólico esencial para la bacteria (56-59). Sin embargo, el descubrimiento del primer antibiótico se había producido en 1928, a partir de un hongo (*Penicillium*) que secretaba una sustancia que se denominó penicilina (Figura 1). La penicilina es un antibiótico β -lactámico que actúa como sustrato de las transpeptidasas, responsables de la formación de los enlaces cruzados del peptidoglicano que forma la pared celular bacteriana y no fue comercializada hasta 1941.

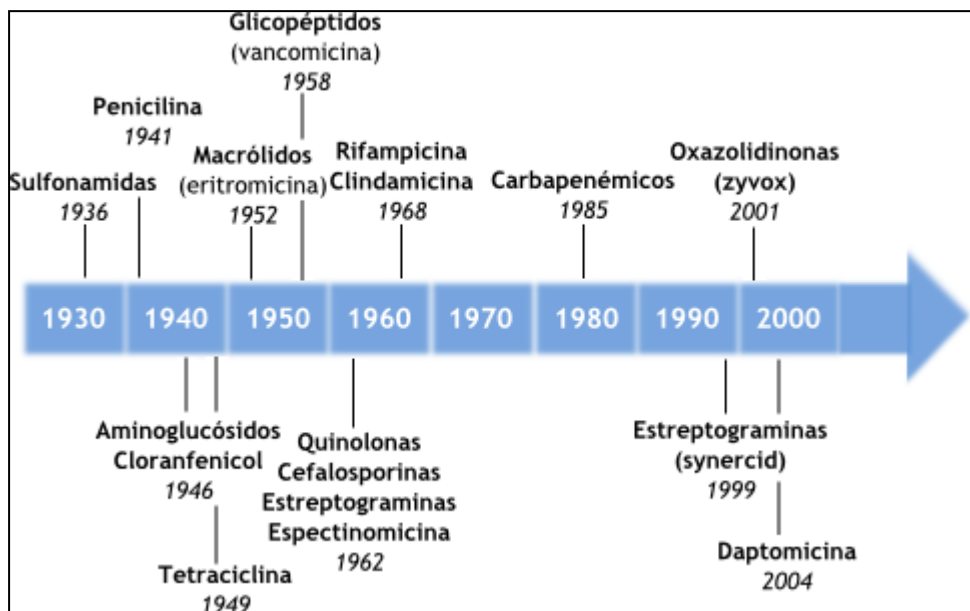


Figura 1. Cronología de la introducción de las distintas familias de antibióticos.

La resistencia a sulfonamidas puede ser debida a mutaciones puntuales en el gen cromosómico *folP* que codifica la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), o a la adquisición de genes codificantes de variantes de DHPS resistentes a las sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*). Los genes *sul1* y *sul2* fueron caracterizados en 1980 en aislados clínicos anteriores a la era preantibiótica (60) pero *sul3* no fue descrito hasta 2003, proveniente de cepas de *E. coli* aisladas de animales de granjas (61). Todos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (62) aunque el gen *sul3* parece menos prevalente que *sul1* y *sul2* (63-67) (Tabla 3). Los genes *sul1* y *sul3* se asocian

mayoritariamente a integrones de clase 1 y estos a su vez se encuentran frecuentemente en plásmidos diseminados (67-72). Los integrones de clase 1 tienen comúnmente su estructura básica conservada con los genes de resistencia, *qacEΔ1* y *sul1*, aunque también pueden tener un segmento 3'CS inusual constituido por *IS440*, *qacH* y *sul3* (Tabla 3) (73-77).

El gen *sul2* se asocia frecuentemente con los genes de resistencia a estreptomicina, *strA* (*aph-3'*)-*strB* (*aph-6*) (78). La resistencia a estreptomicina está clásicamente codificada en el transposon disfuncional Tn5393 de la familia Tn3, situada río-abajo de los genes necesarios para la transposición. Este transposon es originario del patógeno de plantas *Erwinia amylovora*, causante de la enfermedad de los manzanos denominada "fuego bacteriano". El hecho de que dicho transposon tenga dos genes de resistencia a estreptomicina funcionales podría deberse a la gran presión selectiva producida por el amplio uso de estreptomicina para el control de la enfermedad de plantas en diferentes países. A pesar de la transferencia horizontal de los vehículos genéticos de los genes *strA-strB*, los elementos parecen ser diferenciables según el origen de los aislados. Los aislados bacterianos de humanos y animales tienen habitualmente los genes *strA-strB* localizados en pequeños plásmidos de amplio espectro de hospedador, no conjugativos de tipo IncQ como pRSF1010, donde *sul2* está contiguo a los genes *strAB* y Δ ISCR2 o pBP1. Sin embargo, en aislados de plantas los genes se localizan en grandes plásmidos conjugativos con entornos diferentes (Tabla 3, Figura 5) (78).

Por otro lado, el gen *sul2* también se asocia a plataformas con ISCR2 y otros genes de resistencia (florfenicol, tetraciclina o beta-lactámicos) y/o está adyacente al gen metabólico que codifica para una fosfoglucosamina mutase (*glmM*), dentro de diversos contextos genéticos (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Vibrio salmonicida*, *Pasteurella multocida*, *Acinetobacter baumannii*). Esto hace pensar que la secuencia de inserción ISCR2 tiene un papel en la movilización y diseminación de *sul2*, frecuente en plásmidos de amplio espectro de hospedador tipo IncA/C diseminados entre *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* y *Aeromonadaceae* (79). No obstante, también se ha observado en plásmidos IncHI2 e IncI1 (nº acceso GenBank CP001125) de reducido espectro de hospedador o en el cromosoma (80-82). Por otra parte, la transferencia de un plásmido conteniendo el gen *sul2* se observó *in vivo* en el intestino humano (83).

Tabla 3. Características genéticas de los genes adquiridos de resistencia a sulfonamidas.

Gen (tamaño)	Homología nucleotídica con <i>sul1</i>	Homología aminoacídica con <i>sul1</i>	Elementos genéticos asociados	Familias y especies
<i>sul1</i> (840 pb)	-	-	Integrone de clase 1/Tn21-like Plásmidos	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , <i>Aeromonadaceae</i> , <i>Moraxellaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> (clínico y medioambiental)
<i>sul2</i> (816 pb)	64%	49%	Tn5393/ISCR2 Plásmidos conjugativos (IncF, IncA/C, IncHI1, IncHI2, IncI1, IncB) y movilizables (pRSF1010 IncQ y derivados)	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Erwinia amylovora</i>), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Vibrionaceae</i> : <i>Photobacterium damselae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Aeromonadaceae</i> (clínico y medioambiental)
<i>sul3</i> (792 pb)	54%	43%	Integrone de clase 1 inusuales/Tn (IS26 compuesto, Tn21) Plásmidos conjugativos	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>) (clínico y medioambiental)

Desde su introducción, las sulfonamidas solas o en combinación con el trimetoprim (cotrimoxazol) se han usado ampliamente en la práctica clínica, principalmente en el tratamiento de las infecciones urinarias. A partir de 1995 se produjo una disminución del uso humano de sulfonamidas debido a sus efectos adversos aunque siguen utilizándose como promotores del crecimiento en animales en algunos países y en el control de enfermedades bacterianas en plantas (3,37,84). Aun así, los genes de resistencia a sulfonamidas son muy prevalentes en Enterobacterias de origen humano (84,85). Diferentes estudios sobre las causas de su persistencia apuntan al extensivo uso de sulfonamidas en animales, la coselección por otros determinantes de resistencia, el bajo coste biológico de los genes *sul* en determinados plásmidos o su alta transmisibilidad (86,87).

Resistencia a antibióticos B-lactámicos

Los antibióticos B-lactámicos son bacteriolíticos y actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Su anillo B-lactámico, análogo a la D-alanil-D-alanina, que es el péptido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera de peptidoglicano en formación, se une irreversiblemente a las transpeptidasas bacterianas o “penicillin binding proteins” (PBPs), inhibiendo la reacción de los enlaces cruzados que

confieren integridad al peptidoglicano, componente de la pared bacteriana. Como consecuencia, la membrana se debilita y ocurre citólisis (88,89). Desde el descubrimiento de la penicilina, han ido surgiendo compuestos derivados con anillo β -lactámico, como las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, con actividad sobre microorganismos gramnegativos y grampositivos. Desde su introducción en la práctica clínica, los β -lactámicos han sido los antibióticos más utilizados en el ámbito intra y extrahospitalario.

Los mecanismos de resistencia a β -lactámicos son múltiples, como: i) la producción de β -lactamasas, enzimas degradativas de β -lactámico, ii) los cambios en la estructura de las PBPs por mutación o la aparición de nuevas variedades, iii) la disminución de la entrada del antibiótico mediante mutaciones en las porinas, y iv) la expulsión del antibiótico a través de bombas de eflujo (46,90). Sin embargo, la resistencia mediante la producción de β -lactamasas es la más común y constituye actualmente un serio problema en el tratamiento de infecciones hospitalarias y comunitarias por gammaproteobacterias.

Las β -lactamasas se pueden clasificar según su estructura molecular o su función. La clasificación más utilizada es la de Ambler, propuesta en 1991, que se basa en la secuencia aminoacídica de la proteína. Distingue las β -lactamasas de clase A, C y D, que poseen una serina en el sitio activo y se designan serino- β -lactamasas, de las enzimas de clase B que requieren la presencia de zinc para su funcionamiento, denominadas metalo- β -lactamasas. Esta clasificación fue modificada por Bush-Jacoby-Medeiros en 1995 en función del perfil de inhibición que mostraban frente a los inhibidores de β -lactamasas, y así distinguiendo 4 grupos (91):

- i) *Grupo 1 (correspondiente a la clase C de Ambler)*. Incluye enzimas con actividad cefalosporinasa no inhibidas por inhibidores de β -lactamasas.
- ii) *Grupo 2 (correspondiente a las clases A y D de Ambler)*. Grupo heterogéneo de enzimas de amplio espectro de sustrato (penicilinasas, cefalosporinasas, oxacilinasas y carbapenemasas) inhibidas por inhibidores clásicos de β -lactamasas. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) hacen parte de un sub-grupo (2be).
- iii) *Grupo 3 (correspondiente a la clase B de Ambler)*. Incluye enzimas que requieren zinc para su actividad (metalo- β -lactamasas) y cuyos inhibidores son agentes quelantes como EDTA. A diferencia de las carbapenemasas de otros grupos, éstas no son inhibidas por el ácido clavulánico y no hidrolizan monobactámicos.

- iv) *Grupo 4.* Agrupa enzimas no inhibidas por el ácido clavulánico y que no se incluyen en los otros grupos.

B-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Esta grupo engloba a las enzimas que hidrolizan a las cefalosporinas de primera, segunda, tercera (cefotaxima, ceftazidina, cefixima y ceftriaxona) y cuarta generación (cefepima y cefpiroma) y a los monobactámicos (aztreonam). Las *BLEE* son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero no tienen actividad sobre carbapenémicos (imipenem, meropenem y doripenem) ni sobre cefamicinas (cefoxitina). Hay diferentes tipos, las más prevalentes entre *Enterobacteriaceae* son de clase A: TEM, SHV y CTX-M; y las de clase D tipo OXA. Otros tipos menos frecuentes son PER, VEB, GES, TLA o IBC. A su vez hay una elevada diversidad de variantes (mutaciones puntuales) de cada tipo de enzima (91).

Al igual que otros elementos de resistencia, la localización de los genes codificantes de BLEE (genes *bla*) en integrones y/o transposones y estos a su vez en plásmidos ha facilitado su transferencia y posiblemente su persistencia en las poblaciones bacterianas. La expresión de estos genes está regulada por promotores eficientes siendo común la presencia de más de un gen *bla*.

En esta tesis se explora el eventual papel de los antibióticos β -lactámicos así como de otros mecanismos genéticos que puedan influir en la persistencia de los determinantes de resistencia a sulfonamidas y estreptomycin, antibióticos actualmente menos utilizados en la práctica clínica.

1.4.2. Resistencia a biocidas

La resistencia bacteriana a biocidas es generalmente intrínseca debido a la dificultad de entrada del antimicrobiano a través de la membrana celular, o a la capacidad de la célula de expulsar estos compuestos mediante sistemas de eflujo regulados cromosómicamente (43,48,92,93). La ausencia de membrana externa en los microorganismos grampositivos, hace que estos sean generalmente más sensibles a la acción de los agentes biocidas que los gramnegativos. La exposición a biocidas induce frecuentemente alteraciones en la estructura bacteriana (a nivel de proteínas, composición de ácidos grasos o fosfolípidos), en la expresión de mecanismos de expulsión y de mecanismos de respuesta al estrés, cambios en la actividad metabólica y/o cambios

fenotípicos que determinan a su vez cierto nivel de resistencia a los biocidas (Tabla 4) (45,53,94-96).

Tabla 4. Principales mecanismos de resistencia en Enterobacterias a los biocidas estudiados.

Mecanismos de resistencia a biocidas	Biocida	Referencia
Mutaciones en FabI, Aumento de la expresión de FabI, enzima enoil-acil reductasa con menor afinidad, inactivación o degradación enzimática	Triclosan	(21,47,97)
Eflujo activo bombas SMR (e.g. bomba Qac, Sug, KpnEF)	Clorhexidina Cloruro de benzalconio	(74,98-101)
Eflujo activo AcrAB u otras tipo RND y MFS (MdtM), disminución del influjo/permeabilidad de la membrana, biofilms	Clorhexidina Cloruro de benzalconio Triclosan Hipoclorito de sodio	(47,99,101-104)
Activación del regulador transcripcional OhrR ^a	Hipoclorito de sodio	(105)

^a implicado en la resistencia a hidroperóxidos orgánicos.

1.4.2.1. Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo representan el mecanismo de resistencia a biocidas más frecuente, causan tolerancia cruzada a una amplia gama de otros compuestos antimicrobianos (antibióticos, marcadores y metales) (32,48,92,106-108) y contribuyen a la expulsión al exterior de sustratos naturales como metabolitos intermediarios, moléculas de señalización intercelular o de mediación planta-bacteria (42,92,109,110).

Las bombas de eflujo son generalmente de expresión constitutiva y se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano aunque se han descrito también en plásmidos como las bombas Qac, SugE, Tet, OqxAB y MexCD (111,112).

Hay 5 familias principales de sistemas de eflujo (Figura 2, (113)) que pueden originar disminución de la sensibilidad a agentes antimicrobianos: i) familia RND (“Resistance Nodulation-Cell Division”), familia MSF (“Major Facilitator Superfamily”), familia SMR (“Staphylococcal multiresistance”), familia MATE (“Multidrug and Toxic compound Extrusion”) y familia de transportadores ABC (“ATP binding cassette”). Todas estas familias están presentes en bacterias gramnegativas (48,109,114).

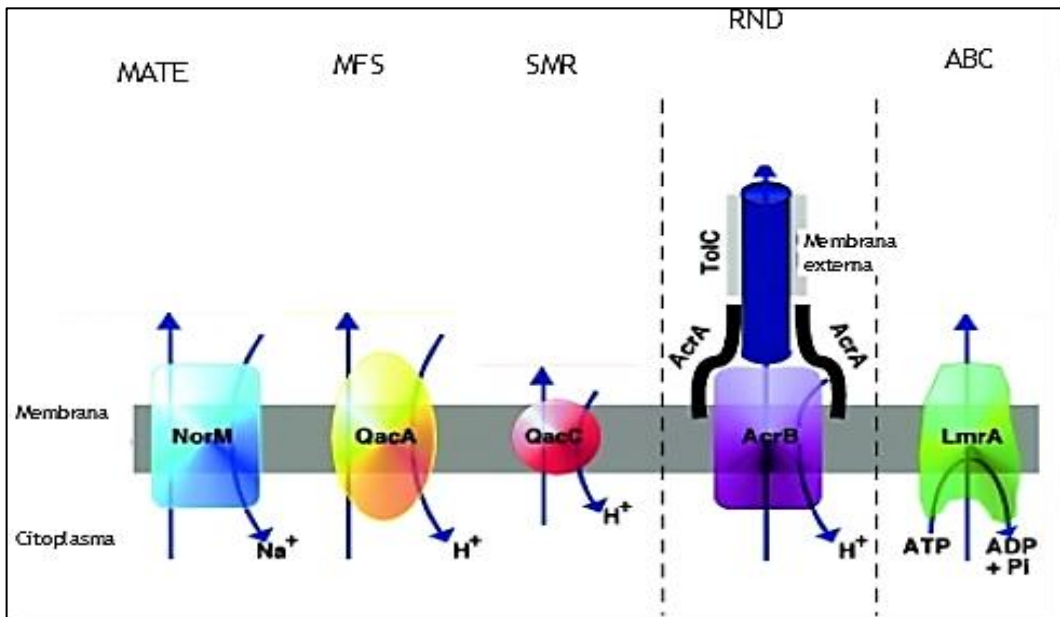


Figura 2. Familias de bombas de eflujo.

Figura adaptada de (110).

Familia RND

Los transportadores de la familia RND están particularmente extendidos entre microorganismos gramnegativos, jugando un papel central en la resistencia clínicamente relevante. Esta familia incluye sistemas tripartitos de bombeo que utilizan el gradiente de H^+ a través de la membrana para generar energía para el eflujo, y cuyos modelos son AcrAB-TolC en *E. coli* y MexAB-OprM en *P. aeruginosa*. Al estar habitualmente asociados a otros mecanismos de resistencia, la acción de esta bomba puede estar enmascarada y por consiguiente infravalorado el nivel de tolerancia proporcionado, en microorganismos de origen hospitalario (106,108,115).

Las bombas tipo AcrAB son las más frecuentemente encontradas en gammaproteobacterias siendo predominantes en especies de la familia *Enterobacteriaceae* (113). Se trata de un sistema tripartito que contiene una proteína transportadora AcrB (eflujo) presente en la membrana interna que capta los substratos tanto desde la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, como desde el citoplasma (116), para ser transportados por la proteína canal de la membrana externa TolC (OMP “Outer Membrane Protein”) y AcrA, una proteína accesoria periplasmática que medía la cooperación entre AcrB y TolC (43,117). Homólogos de la bomba tipo AcrAB existen en especies de la familia *Pseudomonadaceae* (AcrB/MexB), *Campylobacter jejuni*

(AcrB/CmeB) y *Neisseria gonorrhoeae* (AcrB/MtrD). Todos ellos están organizados con una misma sintenia, con el gen regulador adyacente a los genes que codifican para la proteína periplasmática accesoria y la proteína de eflujo de la membrana externa (92,110).

La bomba AcrAB-TolC puede exportar un amplio rango de compuestos como β -lactámicos lipofílicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclinas, rifampicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidixico, bromuro de etidio, acriflavina, ácidos biliares, ácidos grasos de cadena corta, SDS, Triton X-100 y triclosan (93,110,118,119). En *E. coli* y *S. enterica* existen variantes como AcrD (que puede expulsar aminoglicósidos) y AcrEF que son, respectivamente, un 80 y un 88% idénticos a AcrA y AcrB (113,116,120).

La perturbación/inactivación de la bomba tipo AcrAB reduce la virulencia y *fitness* bacteriano, en *E. cloacae* y *S. Typhimurium*, en este último por la disminución de la expresión de la isla de patogenicidad SPI-1 donde están codificados los sistema de secreción tipo III y genes relacionados con quimiotaxis y motilidad, desfavoreciendo así la capacidad colonizadora e infectante (118,121).

Familia SMR

Las bombas de tipo SMR son pequeñas proteínas (de aproximadamente 100 a 150 aminoácidos) caracterizadas por 4 cadenas α -hélice transmembrana que transportan compuestos de naturaleza lipofílica como amplio rango de agentes biocidas catiónicos (sobre todo QACs, pero también tetrafenilfosfonio, metil viológeno, o intercalantes del ADN como bromuro de etidio) o aniones como SDS, y antibióticos (e.g. eritromicina, sulfadiazina, tetraciclinas, trimetoprim y aminoglicósidos) usando el gradiente de H^+ como fuerza motriz (46,49,122,123). Otros sustratos complejos como azúcares, péptidos, carbohidratos, antimicrobianos de alto peso molecular y metales no son transportados. Se ha sugerido que los transportadores SMR podrían ser los precursores de transportadores más grandes como los de la familia de bombas MSF (124). La familia de las bombas SMR, se ha localizado además de en cromosomas, en variedad de plásmidos y elementos transponibles codificantes de resistencia a antibióticos (e.g. β -lactámicos, inhibidores de DHFS y aminoglicósidos).

La familia SMR se subdivide en tres grupos en base a la secuencia y filogenia: (i) “small multidrug pumps” (SMP), (ii) “suppressor of groEL mutation proteins” (SUG), y (iii) “paired small multidrug resistance proteins” (PSMR) (49,123,125).

La **subfamilia SMP** agrupa diversidad de proteínas, codificadas por un solo gen, que incluyen SMR de *Archaea* y *Firmicutes* (e.g. Smr de *S. aureus*, Hsmr de *Halobacterium salinarum* y EbrAB de *Bacillus subtilis*), homólogos de EmrE de Proteobacteria y las proteínas Qac ampliamente distribuidos en Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (e.g. QacF, QacG, QacH, QacJ, QacI, QacK, Tabla 24, apartado 4.1.5.2. (49,113,124,126,127). Las proteínas Smr y Qac se localizan en elementos transferibles, principalmente integrones, transposones y/o plásmidos. La gran abundancia de estas bombas en Actinobacteria y Proteobacteria puede ser explicada porque este tipo de bacterias son hospedadores favorables al tráfico horizontal de genes. Además, la retención de los genes transferidos horizontalmente podría estar fomentada por el uso de un codón preferencial entre integrones de clase 1 (128). La localización de estos genes en elementos transferibles y la presión de selección ejercida por el hombre (consumo y liberación de antibióticos y sustancias de acción antimicrobiana al medio ambiente) habrían facilitado su diseminación entre bacterias filogenéticamente distantes presentes en nichos ecológicos similares (128,129). Es probable que tanto las bombas de eflujo homólogas a SMR y sus actuales hospedadores tengan un origen medioambiental, en vez de provenir de entornos hospitalarios. Incluso cuando estos elementos genéticos se agrupan en orígenes taxonómicas aparentemente mixtos, posiblemente se deba a que los microorganismos comparten nicho ecológico. La diversidad de genes *qac*, de resistencia a biocidas, su frecuente asociación a elementos genéticos de transmisión horizontal prevalentes, junto con la presión de selección debida al uso humano desmedido de antimicrobianos, sugiere la hipótesis de una posible selección purificadora a lo largo de su historia filogenética en microorganismos distantes (74,77).

Algunos estudios han documentado una asociación entre el uso de detergentes o antibióticos y la persistencia de integrones de clase 1 con genes de resistencia a antibióticos y biocidas en aguas, suelos, excrementos de animales, que podrían constituir posibles reservorios medioambientales (68,77,130-132).

La **subfamilia SUG** o **SugE** agrupa proteínas supresoras de mutaciones en la chaperona GroEL (homóloga a la proteína eucariota de choque térmico Hsp60) que forma parte del complejo chaperona GroEL/GroES responsable del plegamiento de proteínas en bacterias. Estas proteínas no transportan compuestos lipofílicos como sucede con las proteínas SMR y parece que son importantes en el transporte de compuestos reguladores de chaperonas. Los genes *sug* están localizados en islas genéticas compuestas, frecuentemente formando unidades transponibles asociadas a plásmidos de enterobacterias y son idénticos al gen *sugE* de *Citrobacter freundii*.

Otras familias

Las bombas más importantes de la familia MFS son NorA y QacA de *Staphylococcus aureus* y PmrA de *Streptococcus pneumoniae*. Estas bombas también usan el gradiente de H⁺ a través de la membrana, para generar energía, y se piensa que actúan, como monómeros. Sin embargo, en microorganismos gramnegativos pueden funcionar como componentes de sistemas tripartitos también utilizando proteínas fusionadas a la membrana y porinas como TolC (133). Las bombas de la familia MATE están presentes en bacterias gramnegativas y grampositivas, compartiendo sustratos con las bombas tipo RND (e.g. agentes catiónicos tóxicos), aunque a diferencia de éstas no son sistemas tripartitos y usan energía proveniente del flujo de H⁺ y de Na⁺. La bomba representativa de esta familia es NorM de *Vibro parahaemolyticus*. Por último, los transportadores ABC no tienen aún un papel establecido en la multirresistencia bacteriana clínicamente relevante, aunque son frecuentes en los genomas de bacterias patógenas. Utilizan ATP como fuente de energía y, al igual que las bombas de las familias RND y MFS, pueden funcionar acopladas a proteínas fusionadas a la membrana y porinas. Proteínas representativas de esta familia son Sav1866 de *S. aureus* y LmrA de *Lactococcus lactis* (48,110,133).

La regulación de los sistemas de bombeo bacterianos se hace mediante reguladores que alteran sus niveles de expresión (hacia arriba o abajo) y puede ser alterada debido a i) mutaciones en los genes represores locales de las bombas (por ej. *acrR*, *mexR*, *tetR*); ii) mutaciones en los genes reguladores globales (como *ramA*, *soxS*, *marA*, *rob*, *rara*, *hns*, *rpoS*, *parRS*, *crc*, *phoPQ*, *evgAS*); iii) mutaciones en el promotor del gen codificante del canal porina (*omp*); e iv) inserciones de elementos río-arriba del gen codificante del canal porina.

La sobreexpresión de reguladores globales puede aumentar la expresión de los componentes de las bombas de eflujo originando un fenotipo de disminución de sensibilidad a diferentes antimicrobianos y biocidas, y cambios en el metabolismo y virulencia (134-139). Esto da lugar a fenotipos pleiotrópicos. La influencia de distintos reguladores globales es importante en diferentes especies de Enterobacterias. Los reguladores H-NS, RpoS, ParRS, Crc o PhoP-PhoQ regulan la expresión de las bombas de expulsión permitiendo la adaptación bacteriana a ambientes variables (115,133,140-148). Los reguladores transcripcionales parálogos MarA, Rob y SoxS de *E. coli* actúan tanto individualmente como en conjunto para controlar la expresión de más de 80 genes implicados en el metabolismo, transporte de hierro, respuesta global de estrés participando en la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), en la

sensibilidad a antimicrobianos (AcrAB) y en la virulencia (135,137,146,149,150). Su regulación está a su vez condicionada por otros genes y también depende de la interacción con compuestos como ácidos biliares, decanoato, salicilato o paraquat (136,151-154). En *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp. se ha caracterizado recientemente el regulador RarA, también de la familia AraC, que controla AcrAB, genes de la biosíntesis de la membrana, OmpF (aumentando su expresión) así como genes metabólicos (disminuyendo su expresión) (139,155). El regulador RamA, que no se encuentra en *E. coli*, tiene un papel dominante en la regulación de la respuesta protectora al estrés oxidativo bacteriano y virulencia, modelando la expresión de las bombas de eflujo tipo AcrAB en *Salmonella* spp. y otras *Enterobacteriaceae*, vía aumento de expresión de AcrB (46,48,134,145,147,156-160). La subunidad de la RNA polimerasa *rpoS* (σ^S) es, sobre todo en *E. coli*, un regulador central de respuesta general a estrés, activado por la exposición a condiciones medioambientales adversas tales como la temperatura, osmolitos, falta de nutrientes, el sistema inmune del hospedador, presencia de biocidas o antibióticos, que favorecen la transcripción directa de cientos de genes (141,142,161). Los niveles de RpoS en la célula están bajo un complejo control por “feedback” que ajusta el equilibrio entre la resistencia al estrés y la capacidad de utilizar diversos nutrientes (162).

Finalmente, el regulador de dos componentes PhoP-PhoQ de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es uno de los principales sistemas de control de la transcripción de genes de virulencia, capaz de modificar la estructura del lípido A (componente de la parte de señalización del LPS integrante de la bicapa lipídica de la membrana externa), lo cual favorece la expresión de un grupo de genes que incrementan la resistencia frente a determinadas moléculas antimicrobianas o al huésped (143,163). Está implicado, además, en la activación de la transcripción de *tolC* en *E. coli*, en conjunto con otro regulador global de dos componentes EvgAS (133).

1.4.3. Tolerancia a biocidas

1.4.3.1. Estudios de determinación de la sensibilidad a biocidas

La sensibilidad a biocidas de los principales patógenos y comensales de humanos y animales ha sido poco explorada a diferencia de lo que sucede con los antibióticos (164,165).

Los puntos de corte clínicos habitualmente usados para el control de la sensibilidad antibiótica se basan en la probabilidad de éxito o fracaso terapéutico y no

son aplicables a biocidas cuya formulación galénica (superficial o tópica) y aplicación es diferente.

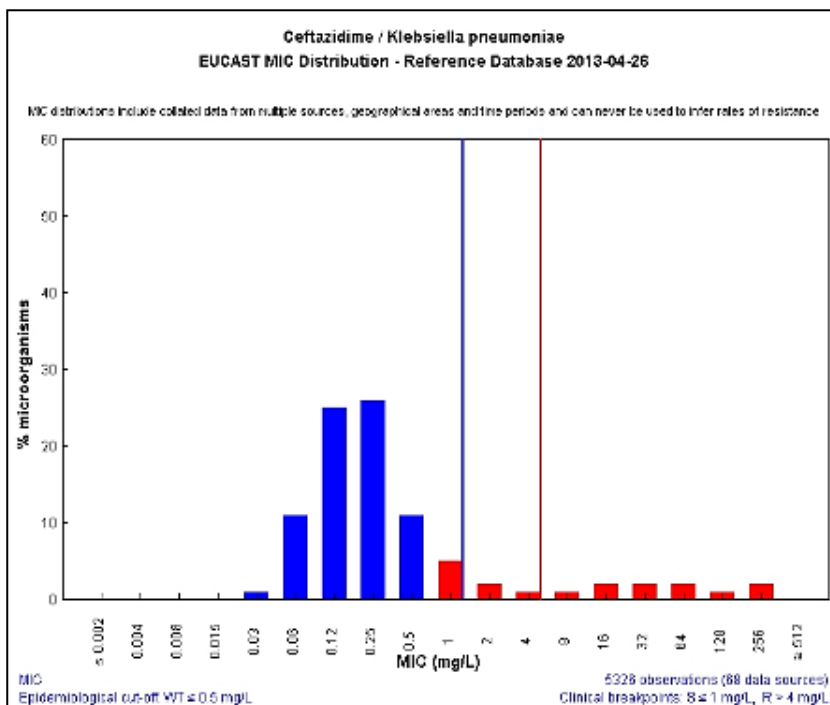


Figura 3. Representación gráfica de la distribución de CMI a un antibiótico en poblaciones bacterianas de una especie. Identificación de puntos de corte epidemiológicos (ECOFF).

La población sensible está representada en azul y la resistente en rojo. El ECOFF corresponde al valor de la línea vertical azul, mientras que el punto de corte clínico corresponde a la línea vertical roja. Figura adaptada de la base de datos de EUCAST (http://www.eucast.org/mic_distributions/).

El punto de corte epidemiológico o “Epidemiological CutOFF- ECOFF” se establece en base a la distribución normal de los valores de CMI de una especie bacteriana frente a un agente antimicrobiano determinado (<http://www.eucast.org>) y se define como el valor de CMI más alto para una especie que no presenta mecanismos de resistencia. Por tanto, las poblaciones con valores de CMI por encima de este valor serían poblaciones con un mecanismo de resistencia, mutacional o transferible, mientras que las que se encuentran por debajo, con una distribución unimodal, corresponderían a la población salvaje (Figura 3) (166,167). Los valores de ECOFF son aplicables con independencia de la vía de administración y parámetros farmacológicos del antimicrobiano, sin variar entre humanos y animales. Las distribuciones de CMI de

referencia y los ECOFFs para muchas especies bacterianas y antibióticos están disponibles en la página web del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, http://www.eucast.org/mic_distributions/). Actualmente, no existen valores ECOFF para biocidas, y consecuentemente, el término de “sensibilidad reducida” sería más correcto para referirse a aislados cuya CMI esté por encima de la distribución normal de CMIs de la población o cuya tolerancia haya aumentado tras la exposición al agente antimicrobiano (168-171).

Los estudios de sensibilidad bacteriana a biocidas y/o antibióticos en aislados de poblaciones naturales en relación con el uso de productos antibacterianos de limpieza e higiene son muy limitados (12,171,172). La correlación entre elevadas CMIs a biocidas y resistencia a antibióticos fuera del contexto experimental no se ha sido claramente demostrada, indicando que no existe o que sea anecdótica en las poblaciones naturales (169,173-178).

1.4.3.2. Estudios *in vitro* de desarrollo de tolerancia a biocidas y antibióticos

El riesgo de seleccionar cepas con sensibilidad reducida a biocidas y antibióticos como consecuencia de la exposición crónica a la que se someten las bacterias medioambientales y clínicas ha fomentado el estudio de los efectos de la exposición a biocidas en diferentes ámbitos (13,30,77,171,179-181).

La selección de resistencia a biocidas fue demostrada por primera vez en cepas de *E. coli* empleando triclosan para seleccionar mutantes tolerantes a éste (19). Posteriormente, numerosos estudios han documentado el desarrollo de tolerancia a biocidas y de resistencias cruzadas a antibióticos en aislados de diferentes especies como *E. coli*, *Salmonella enterica*, *S. marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Enterobacter asburiae*, *Aranicola proteolyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. de diversos orígenes (18,33,103,164,182-188). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios se ha centrado en la adaptación del patógeno *S. enterica*. Diferentes estudios han demostrado que la exposición a QACs, triclosan o compuestos derivados del benceno como ciclohexano, alteran la sensibilidad a antibióticos de manera diferencial, dependiendo de la especie bacteriana estudiada o las condiciones de exposición (36,103,182,184,185,188-190). Generalmente la exposición continuada de *S. enterica* a biocidas QACs, triclosan, compuestos oxidantes o solventes

orgánicos provoca un aumento en las CMI a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y ciprofloxacino, mientras que en *E. coli* el aumento de tolerancia a triclosan, ha conducido a una mayor resistencia a antibióticos fenólicos (cloranfenicol y florfenicol), y/o a un aumento de la sensibilidad a aminoglicósidos (36,173,182,186,191). A pesar de que los experimentos en el laboratorio intenten reproducir las condiciones que podrían ocurrir naturalmente, la selección y mantenimiento de la tolerancia a biocidas en el medio ambiente estarían condicionadas por diferentes factores como la disponibilidad de nutrientes, presencia de otros microorganismos o de otros agentes de estrés (188,192).

1.4.4. Resistencia fenotípica y resistoma intrínseco

La **resistencia fenotípica** hace referencia a situaciones transitorias en las que una población sensible a un determinado compuesto se muestra refractaria a su acción sin que ocurran alteraciones genéticas. Esta resistencia no es hereditaria y puede estar causada por la formación de biofilms, el crecimiento en fase estacionaria o persistencia, la formación de esporas, u otras situaciones fisiológicas donde se produce una disminución del efecto del agente antimicrobiano (52,144,191,193-197). A los genes implicados en la resistencia fenotípica a agentes antimicrobianos, se le denomina *resistoma intrínseco* (55,198). Se ha documentado que la sensibilidad a antimicrobianos depende de la consonancia entre diferentes elementos, no solo los genes de resistencia clásicos, sino también otros implicados en procesos metabólicos básicos (**resistoma intrínseco**), que son de relevancia para la *resistencia intrínseca* de patógenos bacterianos (55,198).

La exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos puede afectar diferentes sistemas reguladores globales y de respuesta al estrés que, a su vez, inducen alteraciones de la sensibilidad a diferentes compuestos, del metabolismo y de la virulencia (51,134,199-201). Aunque el efecto de biocidas sobre el panproteoma microbiano ha sido escasamente investigado, estudios esporádicos han documentado variaciones en función de la especie (197,201-204). Por ejemplo, la exposición a concentraciones subinhibitorias de triclosan puede afectar la sensibilidad a antimicrobianos, atenuar la virulencia y la formación de biofilms en *Salmonella enterica* o *S. aureus* (35,36,53,118,205,206). No obstante, en *Listeria monocytogenes*, el triclosan y los QACs inducen una sobreexpresión de genes de virulencia/adaptación (205). En *E. coli* se han descrito procesos celulares de regulación del estrés oxidativo y osmótico tras la exposición a QACs (197). Se han contemplado además significativos cambios

morfológicos como la filamentación y diferencias en la cinética de crecimiento entre la célula bacteriana expuesta a biocidas y la respectiva cepa salvaje (191,197,206).

El uso creciente de técnicas de caracterización fenotípica y genotípica de alto rendimiento, además de la secuenciación de genomas bacterianos de patógenos, junto con el desarrollo de la modelización computacional, proporciona actualmente una mayor comprensión de las interacciones entre las redes biológicas metabólicas y las características particulares de cada microorganismo. Estos avances están abriendo el camino hacia una mejor comprensión de la complejidad de los comportamientos biológicos en respuesta a determinados estímulos provocados por el entorno como la presencia de antimicrobianos (51,204,207-212). Las bases del uso de biocidas con fines domésticos o industriales deben ser monitorizadas y reguladas como medida para estudiar, prevenir y controlar la aparición de cepas multirresistentes.

1.5. ECOLOGÍA DE LAS UNIDADES DE SELECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Los genes de resistencia se localizan frecuentemente en elementos genéticos transferibles entre bacterias (mobiloma) y que dada su estructura modular tienen gran posibilidad de recombinarse a nivel intra e intercelular y entre genomas de la misma o diferente especie, dotando a las poblaciones bacterianas de gran adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos y favoreciendo así la diseminación y persistencia de las resistencias (213) (Figura 4).

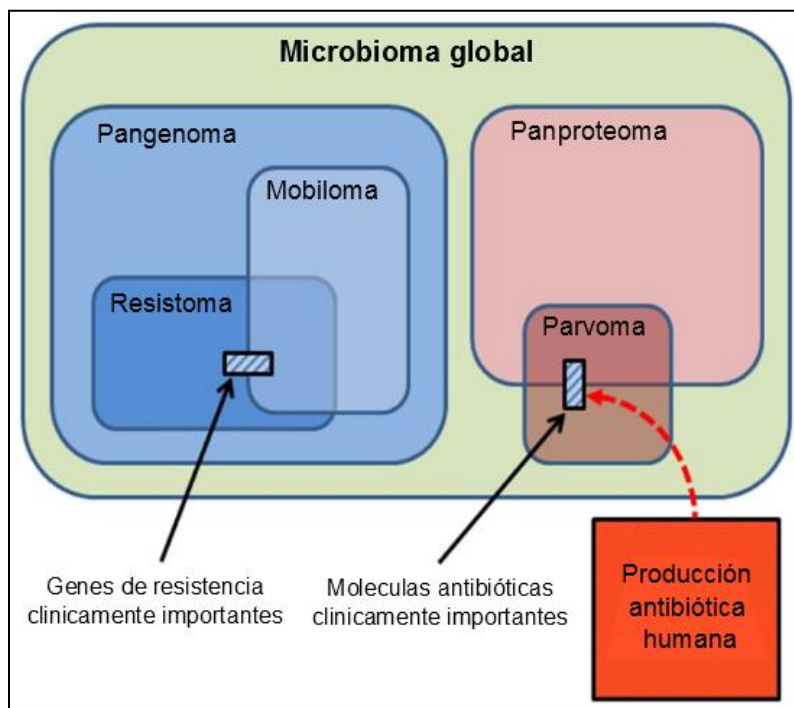


Figura 4. Interacción de los antibióticos sobre las diferentes unidades de selección de un microbioma.

Figura adaptada de la referencia (198).

A continuación, se resumen los principales elementos genéticos móviles asociados con la adquisición y diseminación de la resistencia a antibióticos (resistoma).

1.5.1. Consorcios bacterianos

Clones, complejos clonales, poblaciones, comunidades y ecosistemas son unidades de selección, que determinan la adquisición, persistencia y diseminación de genes de resistencia. Un término cada vez más utilizado en Salud Pública es el de “complejos clonales de alto riesgo” (“High-Risk Clonal Complexes- HiRCC”) que se definen como clones con elevada capacidad de colonización, diseminación y persistencia en diferentes nichos, capaces de adquirir genes adaptativos incluyendo aquellos de resistencia frente a agentes antimicrobianos (214). Estos clones se encuentran distribuidos globalmente y constituyen los principales vehículos de diseminación de la resistencia (215).

Las especies más frecuentemente resistentes a agentes antimicrobianos son patógenos oportunistas frecuentemente causantes de infecciones, que forman parte de

la flora gastrointestinal de animales y humanos, miembros de Proteobacteria y Firmicutes, en especial de las familias *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcaceae* y *Streptococcaceae* (9,216). Estos grupos bacterianos al ser parte de la flora comensal están en contacto con diferentes bacterias en ambientes que, bajo presión selectiva, pueden favorecer la adquisición y diseminación de material genético (9,69,217-223). Dentro de las enterobacterias, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Salmonella* son las especies más frecuentemente identificadas asociadas a infecciones nosocomiales y comunitarias. *E. coli* causa diversos cuadros intestinales y extraintestinales (diarrea, infecciones urinarias, septicemia y meningitis neonatal) y *K. pneumoniae* puede dar lugar a episodios de neumonía, septicemias y meningitis. *S. enterica* es un residente habitual de hospedadores animales aunque no es comensal intestinal, siendo el agente etiológico de gastroenteritis y de la fiebre tifoidea en humanos.

Para *E. coli* se definen habitualmente 4 grupos filogenéticos que se subdividen en A (A₀ y A₁), B1, B2 (B₂, B₃) y D (D₁, D₂) (224-226). Las cepas de los filogrupos A y B1 son generalmente comensales, mientras que las cepas de los filogrupos B2 y D son responsables de infecciones extraintestinales. Existen cepas de *E. coli* con un fenotipo muy similar pero genéticamente muy distintas que se han asociado a nuevos linajes de origen críptico (clados de I a V). El genotipo A₀ fue mayoritariamente asociado a los clados II, III, IV y V, mientras el genotipo B₂ fue asociado sobre todo con el clado I (225). La expansión clonal de determinados HiRCCs de *E. coli* de los filogrupos B2 (ST131 y ST405), A (ST10), B1 (ST155 y ST393), o D (ST69 y ST648), ha sido documentada en numerosos estudios (215,227,228).

La clasificación en filogrupos de *K. pneumoniae* se divide en KpI, KpII y KpIII, siendo KpI el más frecuentemente asociado a infecciones en humanos y animales, y KpIII raramente aislado (229,230). *K. pneumoniae* exhibe una gran variabilidad genética con una menor diversificación en complejos clonales ya que una gran parte de los aislados resistentes se agrupan en lo que se conoce como grupo clonal GC258, asociado a la diseminación de genes que confieren resistencia a carbapenemasas tipo KPC (231-235). El GC258 incluye clones ST258, su variante ST11, entre otras, también relacionado con la diseminación de BLEEs en diferentes áreas geográficas (235,236).

En general, la prevalencia de aislados de *Enterobacteriaceae* que han adquirido secuencialmente genes de resistencia a todos los agentes antimicrobianos y biocidas introducidos en el arsenal terapéutico ha aumentado significativamente desde la introducción de los antibióticos en el arsenal terapéutico. Los elementos genéticos móviles que adquieren nuevos caracteres adaptativos contienen también genes de

resistencia a antimicrobianos usados desde principios de la era antibiótica, como sulfonamidas, estreptomina, biocidas o metales descritos en aislados de la era preantibiótica (14,237-239).

1.5.2. Plásmidos

Los plásmidos son elementos extracromosómicos con capacidad de replicación autónoma, que constituyen uno de los principales mecanismos de intercambio genético entre bacterias (240). Presentan una *región constante* que contiene los genes responsables de funciones esenciales (e.g. replicación, mantenimiento y transferencia), y una *región variable* donde están codificados los determinantes genéticos que confieren alguna ventaja adaptativa (e.g. resistencia a antibióticos, biocidas o metales; factores de virulencia, bacteriocinas).

Los plásmidos se pueden clasificar en base a diferentes criterios como el tipo de *replicación* (“theta” y “rolling circle”-RC), la capacidad de transferirse (conjugativos y noconjugativos o movilizables), el número de copias y el rango de hospedador (amplio y reducido espectro).

Los **plásmidos conjugativos** incluyen plásmidos con diferentes mecanismos de replicación y conjugación y suelen ser >30 kb. Dos plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad no pueden propagarse de forma estable en la misma célula (241). Epidemiológicamente, la clasificación según el grupo de incompatibilidad (*inc*) permite trazar la difusión y evolución de plásmidos transmisibles (242). Esta caracterización se realiza por un sistema de tipaje por PCR e hibridación basados en la identificación de secuencias de las regiones de origen de replicación (*ori*), control del inicio de replicación (*cop/inc*) y la replicación y su control (*rep*). Entre los plásmidos de *Enterobacteriaceae* se conocen por el momento 21 grupos de incompatibilidad diferentes (HI2, HI1, I1- γ , X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O, B, C, D, FI, FII, FIV, FV, FVI). La caracterización plasmídica se puede extender a la determinación de la secuencia de las relaxasas (MOB), proteínas que inician y terminan el procesamiento del ADN conjugativo (243,244). Existen plásmidos cuyo mecanismo de control de la replicación se realiza mediante iterones como en IncP, IncHI1 e IncHI2, mientras que el control “antisense” ocurre en plásmidos de tipo IncFIIA, IncFIC, IncZ y plásmidos del complejo IncI (IncB/O, IncK, IncI1 e IncL/M). También es frecuente y propio de algunos grupos Inc haber más que un replicón o replicones mosaico. Los plásmidos conjugativos

pueden tener un amplio rango de hospedadores (IncP, IncN, IncA/C) o un espectro reducido a la familia *Enterobacteriaceae* (IncFII, IncHI2, IncI o IncX) (245,246).

Además de conferir resistencia a antibióticos de diversas familias químicas (sulfonamidas, β -lactámicos, quinolonas, aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclina u otros) los plásmidos conjugativos promueven la diseminación de una gran variedad de determinantes incluyendo resistencia a metales pesados (mercurio, arsénico o plata), resistencia a biocidas (compuestos de amonio cuaternario-QACs, bromuro de etidio-BrEt, entre otros), virulencia y de metabolismo de compuestos inusuales (247-249).

Los **plásmidos no conjugativos o movilizables** son de pequeño tamaño (<15kb) y por tanto con alto número de copias. Poseen una región constante constituida por el origen de replicación, *ori* y el gen *relaxasa* necesario para la movilización (*mob*). Estos plásmidos solo se transfieren por conjugación en presencia de un plásmido conjugativo auxiliar. Los plásmidos movilizables también codifican resistencia y virulencia (250,251). Los plásmidos más representativos de este tipo son los plásmidos Col y los plásmidos IncQ e IncX. Los primeros, frecuentes principalmente en *E. coli*, son productores de colicinas con efecto citotóxico sobre otras bacterias. Los plásmidos tipo ColE se han asociado a resistencia a kanamicina, quinolonas, β -lactámicos (*bla*_{CMY} y *bla*_{CTX-M-17}) o carbapenémicos (*bla*_{KPC-2}) (252,253). Los plásmidos IncQ se caracterizan por su amplio espectro de hospedador, que incluye microorganismos gramnegativos, Actinobacteria, Cyanobacteria y células de plantas o animales. El prototipo de plásmidos IncQ es pRSF1010, que contiene genes de resistencia a sulfonamidas y estreptomycin (*sul2* y *strA-strB*) (Figura 5). Gracias a que este plásmido es muy ubicuo y debido a la transposición y recombinación homóloga (254), el conjunto de genes de resistencia se ha diseminado, persistiendo desde al menos 30 años, en islas genéticas ampliamente distribuidas en diversos contextos plasmídicos.

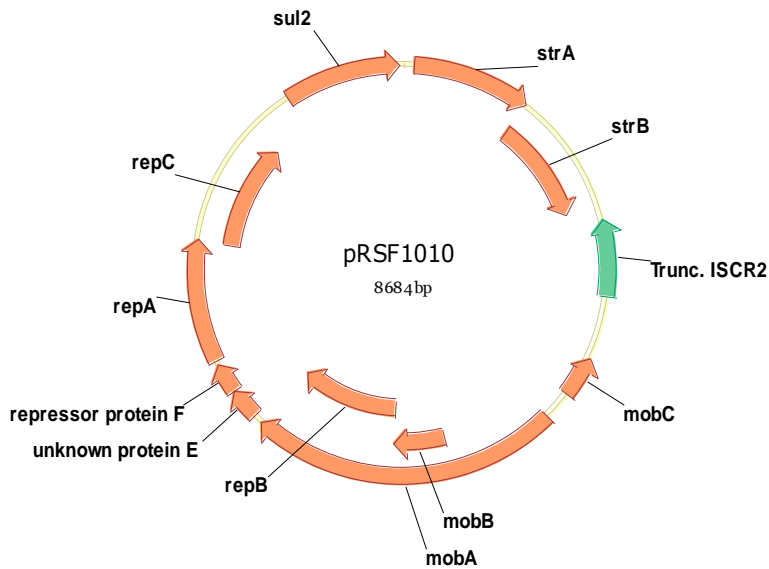


Figura 5. Representación gráfica del plásmido IncQ pRSF1010.

1.5.3. Transposones

Los transposones juegan un papel importante en la movilización intra y extracelular de genes adaptativos incluyendo aquellos genes que confieren resistencia a compuestos de acción antimicrobiana (antibióticos β -lactámicos, carbapenémicos, sulfonamidas, estreptomicina, tetraciclina, trimetoprim, cloranfenicol; metales como mercurio, cobre o cadmio; y diferentes biocidas) (73,255-258). Existen cuatro tipos de transposones en enterobacterias en base a su estructura y mecanismo de transposición: i) transposones compuestos o transposones de clase I, ii) transposones de clase II, iii) transposones de la familia Tn5090-Tn7 y iv) transposones conjugativos. Los tres primeros tipos son los más comúnmente asociados a resistencia a antibióticos en enterobacterias y derivan de elementos previamente detectados en aislados identificados hace miles de años (9,256).

Las **secuencias de inserción** codifican una transposasa, limitada a los extremos por secuencias cortas repetidas e invertidas (IR_L e IR_R “Inverted Repeat”, “left” y “right”, respectivamente). La transposición de la mayoría de IS genera repeticiones directas (DR “Direct Repeat”) de 2-14 pb. Se conocen más de 800 ISs correspondientes a 86 géneros bacterianos representativos de 196 especies de eubacterias y archaeae (<https://www-is.biotoul.fr/>). Según el modo de transposición hay un grupo de ISs mayoritario que se caracteriza por poseer una secuencia aminoacídica conservada de

tipo DDE e incluye IS10, IS550, IS911 y las transposasas del bacteriófago Mu y de Tn7 y otro grupo que muestra similitud con enzimas asociadas a replicones que utilizan un mecanismo de replicación de círculo rodante como IS91, IS801, IS1294 y ISCR1 (“rolling circle replication, RCR”) y no poseen repeticiones invertidas terminales (81,259). Este último grupo solo requiere un elemento de inserción para la movilización de genes. En la clase atípica de secuencias de inserción, designada “ISCRs-Insertion Sequence Common Regions”, hay numerosas familias de elementos ISCR, responsables de la movilización de prácticamente todas las clases de genes de resistencia a antibióticos u otros determinantes (81). La familia IS1111 (subfamilias IS110/IS492 como IS4321 e IS5075, ISEcP1) parecen ser recombinasas sitio-específicas que no generan duplicación de su sitio de inserción, siendo frecuente su asociación con regiones de resistencia (Tn21 y derivados e integrones) (260,261). Algunas familias de IS están frecuentemente asociadas a regiones de resistencia como parte de transposones compuestos que se mueven como unidades modulares. Otro ejemplo bien conocido es la IS26, presente en múltiples copias en los genomas de gramnegativos, y que está implicada en la clusterización de genes de resistencia a antibióticos, virulencia u otras funciones.

Los **transposones compuestos o de clase I** consisten en dos copias de una IS con la misma o distinta orientación, que flanquean genes con diferentes funciones principalmente resistencia a antibióticos o funciones catabólicas y también otros que contribuyen a la transposición. Los ejemplos más representativos de transposones de clase I en *Enterobacteriaceae* son Tn5 (IS50, kan) y Tn1525 (IS15, kan) que confieren resistencia a kanamicina y Tn10 (IS10, tet) que confiere resistencia a tetraciclina. Actualmente, los transposones formados por dos copias de IS26 son extraordinariamente frecuentes (44,67,262).

Los **transposones de clase II** son los más prevalentes en *Enterobacteriaceae*, codifican para una transposasa, una resolvasa y una región de ADN variable, todo ello flanqueado por dos IRs. Esta familia incluye los principales elementos genéticos implicados en la captura y movilización de los genes de resistencia y que son los transposones derivados de Tn3 (Tn3, Tn5393, Tn5403) y los derivados de Tn501 (Tn21, Tn501, Tn1721), donde la orientación de la transposasa (*tnpA*) y de la resolvasa (*tnpR*) difiere. La mayoría de los transposones derivados de Tn501 tienen un operón de resistencia al mercurio y un integrón de clase 1 (con genes de resistencia a antibióticos y biocidas) (258). El derivado no mercurial, Tn1721 tiene una estructura inusual poseyendo resistencia a tetraciclina (*tetA* y *tetR*) (260).

La identificación de plataformas modulares complejas que incluyen transposones de distintas clases/subgrupos (como Tn3, Tn1721, Tn21, Tn1696, o Tn5393), e integrones, parece ser un fenómeno frecuente que ha influenciado la evolución de plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad, como IncFII, IncW o IncHI2 (9,260). Otros genes “recientes” como *bla_{KPC}* fueron directamente reclutados por transposones derivados de Tn3 específicos de hospedador como Tn4401, un transposon derivado de Tn5403 de *Klebsiella* que pertenece a la subfamilia Tn3 (238).

La familia Tn7 engloba al transposon mercurial Tn5090, a los transposones asociados a integrones de clase 1 (Tn402), y de clase 2 con resistencia a trimetoprim y a metales pesados (Tn7), a Tn552 de *Staphylococcus aureus* y a los transposones del fago Mu (78,259). Su módulo de transposición está formado por cuatro proteínas (TniABQR en Tn402 y Tn5053 o TniABCD en Tn7). Se caracterizan por un mecanismo de transposición replicativa en dos pasos que incluye la formación de cointegrados y su resolución en un sitio *res*. A diferencia de los transposones Tn3 la formación de cointegrados requiere la acción de varios genes en lugar de uno solo.

Los transposones conjugativos no son abordados en esta Tesis.

1.5.4. Integrones de clase 1

Los integrones son sistemas de recombinación sitio-específica que facilitan la captura de material genético exógeno siendo vectores eficientes en la diseminación de genes de resistencia. Se componen de 3 regiones: el extremo 5' conservado (5'CS “5'-conserved sequence”), una zona variable y el extremo 3' conservado (3'CS “3'-conserved sequence”). En la región 5'CS está codificada la integrasa (*intI1*), el sitio primario de recombinación (*attI*) y el promotor (Pc). La integrasa promueve la recombinación de los genes casetes circulares en el sitio de integración *attI* adyacente. La transcripción de los genes casetes está facilitada por el promotor. En cambio, en el extremo 3'CS se encuentran genes de resistencia como *qacEΔ1*, que codifica para una bomba de eflujo que confiere resistencia a biocidas, sobre todo a compuestos de amonio cuaternario, o como *sul1*, que codifica para una dihidropteroato sintasa (DHPS) con baja afinidad por las sulfonamidas originando resistencia a estas, además de ser posible encontrar el *orf5* de función desconocida (Figura 6) (76,263,264). Hay, por el momento, descritas 5 familias de integrones (clase 1, 2, 3, 4 y 5) clasificadas en función de la secuencia de la integrasa y se conocen actualmente más de 60 genes casetes diferentes (<http://www2.chi.unsw.edu.au:8080/rac/>). Los integrones de clase 1 son los más frecuentes y están ampliamente diseminados a nivel clínico y medioambiental entre los

miembros de las familias *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* y *Pseudomonadaceae*, pudiendo ocurrir en bacterias grampositivas también (77,265). Son transposones defectivos de Tn402, asociados frecuentemente a transposones de la familia Tn3 o a secuencias de inserción como IS26 o IS6100 que truncan el módulo *tni* (67,70,257,258,266-270). Su movilidad, y por tanto su diseminación, depende de otros elementos transferibles como transposones compuestos (secuencias de inserción) y/o plásmidos conjugativos (67,262,271-274).

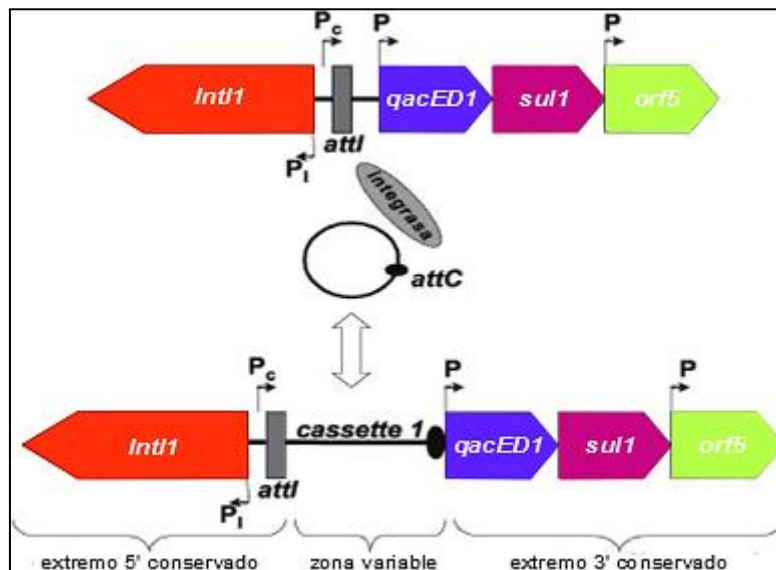


Figura 6. Representación gráfica de un integrón de clase 1.

Figura adaptada de la referencia (275).

La parte variable de los integrones de clase 1 contiene diferentes genes casetes de resistencia a β -lactámicos, trimetoprim, cloranfenicol, aminoglicósidos, macrólidos, fosfomicina y rifampicina (*bla*, *dfr*, *cml* o *cat*, *aac* o *aad*, *ere*, *fos*, *arr*, respectivamente). Otros genes de resistencia pueden localizarse río-abajo en la región 3'CS (*bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-2}) dentro de integrones que tienen un extremo 3'CS inusual o duplicado y asociado a una región que incluye *ISCR1*.

Hipotesis de trabajo y objetivos

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El aumento espectacular de microorganismos resistentes a la mayoría de los antibióticos del arsenal terapéutico ha sido facilitado por la amplificación de elementos genéticos transferibles que han adquirido progresivamente genes adaptativos, frecuentemente, genes de resistencia a otros agentes antimicrobianos como biocidas y metales. A pesar del amplio uso de biocidas en hospitales, agricultura, veterinaria y en el ámbito doméstico, hay pocos datos sobre sensibilidad y mecanismos de resistencia a estos compuestos en patógenos de interés clínico y veterinario.

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que el uso masivo de biocidas habría facilitado no solo la aparición de resistencias a los mismos sino la coselección de resistencia a antibióticos en patógenos de importancia biomédica y veterinaria. Esta tesis está enfocada a analizar genotípica y fenotípicamente las plataformas genéticas transferibles que confieren resistencia a antibióticos y biocidas, y evaluar la aparición de resistencias a estos dos grupos de agentes antimicrobianos tras la exposición de especies de la familia *Enterobacteriaceae* a concentraciones selectivas de antibióticos y/o biocidas.

Los **objetivos generales** de esta tesis son:

1. Determinar la influencia de los elementos genéticos que confieren resistencia a los primeros antibióticos y biocidas usados en la práctica clínica y veterinaria (sulfonamidas) en la selección y amplificación de elementos genéticos de transferencia horizontal (ETH) (clones, transposones y/o plásmidos) contemporáneos globalmente diseminados.
2. Evaluar la influencia del uso de biocidas en la selección de resistencia a antibióticos. Determinar el efecto de los agentes biocidas más utilizados en la práctica clínica y en la industria alimentaria (sales de amonio cuaternario, clorhexidina y triclosan) sobre la selección, diseminación y persistencia de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

1. Caracterizar fenotípica y genotípicamente los determinantes genéticos involucrados en resistencia a las sulfonamidas (*sul*) y sales de amonio cuaternarios (*qac*) en aislados clínicos contemporáneos.
2. Determinar la sensibilidad a biocidas de uso frecuente en los principales patógenos humanos y animales (Enterobacterias y Firmicutes) y establecer puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) que permitan identificar las poblaciones con sensibilidad reducida. Establecer asociaciones entre los valores de sensibilidad a los biocidas y la sensibilidad/resistencia a los antibióticos, o con otros aspectos epidemiológicos.
3. Determinar el impacto de la exposición a biocidas y/o antibióticos sobre la aparición de resistencia o tolerancia a estos compuestos en las especies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*.
4. Evaluar el impacto de la sensibilidad a biocidas/antibióticos sobre el metabolismo bacteriano utilizando microarrays fenotípicos y genotípicos de expresión y análisis del coste biológico.
5. Analizar los genes involucrados (activados o reprimidos) en la variación de sensibilidad a los biocidas y comparar la respuesta de expresión génica entre clones naturales de *S. enterica* de origen animal y mutantes obtenidos *in vitro* aplicando herramientas de *high throughput* (microarrays de expresión).

Material y Métodos

3.1. MATERIALES

3.1.1. Medios de cultivo

- **Caldo Luria (LB)** (*Laboratorios Conda S.A., Madrid, España*)
Polvo disuelto en agua y autoclavado.
- **LB agar** (*Laboratorios Conda S.A., Madrid, España*)
Polvo disuelto en agua y autoclavado.
- **McConkey agar** (*Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, GB*)
Polvo disuelto en agua y autoclavado.
- **Caldo y agar Muller Hinton (MH)** (*Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, GB*)
Polvo disuelto en agua y autoclavado.
- **Agar sangre** (*Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, GB*)

3.1.2. Reactivos

Antibióticos y biocidas

Tabla 5. Soluciones de biocidas y antibióticos.

Antimicrobiano	Solvente/ Diluyente	Solución stock (mg/L)	Rango concentración (mg/L)
Triclosan (Sigma 72779)	100% methanol/ Caldo MH	32	0.015-16
Cloruro de benzalconio (Sigma B6295)	Caldo MH	128	4-64
Clorhexidina (Sigma C9394)	Caldo MH	512	1-256
Hipoclorito de sodio (Sigma 425044)	Caldo MH	262144	4096-131072
Ciprofloxacino (Sigma Y0000198)	Agua	5120	0,002-512
Trimetoprim (Sigma 02718)	ClH o ácido láctico 0,05 M (10% del volumen final)/ Agua	320	0,032-32
Estreptomina (Sigma S6501)	Agua	5120	0,5-512
Sulfametoxazol (Sigma S7507)	½ volumen de agua caliente + mínima cantidad de NaOH 2,5M/ Agua	5120	0,5-512
Kanamicina (Sigma B5264)	Agua	100	50-150
Ampicilina (Sigma A1593)	Agua	100	0,5-4
Ceftazidima (Sigma C0690500)	Agua	400	0,125-4

Tabla 6. Antibióticos testados por difusión en disco o en gradiente.

Antimicrobianos	Rango concentración en tira (mg/L) ^a	Concentración del disco (µg) ^b
Ácido nalidíxico	-	30
Amicacina	-	30
Amoxicilina-ácido clavulánico	0.03/0.015-64-32	20/10
Ampicilina	0.125-256	-
Apramicina	-	15
Aztreonam	0.06-128	-
Cefepima	0.06-128	-
Cefotaxima	0.125-256	30
Ceftazidima	0.06-128	30
Cefuroxima	0.125-256	-
Ciprofloxacino	0,002-32	5
Cloranfenicol	0,016-256	30
Eritromicina	0,016-256	-
Espectinomina	-	10
Estreptomicina	-	10
Gentamicina	0,016-256	10
Gentamicina	-	10
Imipinem	0,002-32	-
Kanamicina	-	30
Neomicina	-	30
Netilmicina	-	30
Nitrofurantoína	-	300
Sulfonamidas	-	300
Tetraciclina	0,016-256	35
Tobramicina	-	10
Trimetoprim	-	5

^a (Oxoid Lda., Basingstoke, Hampshire, GB); ^b (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia)

Otros

Los autoclavados se hicieron a 121 °C durante 20 min.

- **Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona- (CCCP)** 5 mM (Stock 50x preparado con 3 partes de metanol para 2 partes de agua estéril). (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **Bromuro de etidio (BrEt)**. Stock 1% en agua para visualización de ácidos nucleicos; 1mg/L para ensayo de acumulación de BrEt. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido-X-Gal** (Stock 20 mg/mL disuelta en DMSO y almacenada a -40°C protegida de la luz con papel aluminio). Para clonación concentración final en placa: 40 µg/mL (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido-IPTG** (Stock 100 mM en agua y filtrado).
 Para clonación concentración final en placa: 0,1 mM.
 Para expresión de genes clonados: 0,5mM (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)

- **Lisozima.** La solución fue preparada disolviendo el polvo en Tris-HCl 10mM pH=8,0 a la concentración final requerida. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **Proteinasa K** 20 mg/mL en agua. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **SDS** 20% en agua. Esterilización con filtro milipore. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **Salcosyl** 20% en agua. Autoclavar. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **TEG** (50mM Tris-HCl pH=8,0, 10 mM EDTA, 2% glucose en agua)
- **Acetato de sodio** 3M, pH 5 en agua. Autoclavar. (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **Agarosa D-5, D-1 Low EEO** (Laboratorios Conda S.A. Pronadisa, Madrid, España)

3.1.3. Soluciones

- **Buffer TAE 1X** (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH=8). Stock de TAE 50X
- **Buffer TBE 0,5X** (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA, pH=8). Stock de TBE 10X
Preparación: 108 g Tris base, 55g ácido bórico y 40 mL EDTA 0,5M pH=8,0, completar hasta 1L con agua ultra pura y autoclavar.
- **Buffer salino fosfato PBS** (1.53g NaCl, 1.16 g Na₂HPO₄, 0.6 g KH₂PO₄. Completar hasta 200 mL con agua destilada y autoclavar.
- **Buffer TE 1X** (5 mL Tris HCl 1 M, 2 mL EDTA 0,5 M completar hasta 1L con agua y autoclavar.
- **Tris-HCl 1M**, pH7,6 en agua. Autoclavar.
- **EDTA 0,5M** pH8 en agua. Autoclavar.
- **NaCl 5M** en agua. Autoclavar.
- **Solución salina (0.9% NaCl en agua)** (comercial)
- **Fenol:cloroformo:Alcohol isoamilico (25:24:1)** (*Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU*)
- **NaOH 10N** en agua. Esterilización con filtro milipore.
- **SSC 20X** [3M NaCl, 0,3M Na₃(C₃H₅O(COO)₃)] en agua. Esterilizar y diluir 1:10 para SSC 2X
- **NaOH 0,4N** en agua. No autoclavar.
- **SDS 0,1%** en agua hasta hervir para remover sondas de membranas de Southern blot.
- **MgCl₂ 1M** en agua. Autoclavar.
- **NaH₂PO₄.H₂O 0,5M** pH7,0 en agua. Autoclavar.
- **Buffer de hibridación [NaCl 0,5M + reactivo de bloqueo 4% (W/V)]** mezclados con buffer de hibridación del kit y agitados vigorosamente durante 2h a temp. ambiente.
- **Buffer primario de lavado:** 120g urea, 8,7g NaCl, 100 mL NaH₂PO₄.H₂O 0,5M pH=7,0, 1mL MgCl₂ 1M, y 2 g de reactivo de bloqueo y disolver en 700 mL de agua desionizada, 1g SDS y completar el volumen hasta 1L.
- **Buffer secundario de lavado:** 121g Tris base y 112g NaCl en 800 mL de agua desionizada, 1g SDS y completar el volumen de 1L. Autoclavar. Puede almacenarse a 4°C por 4 meses. La solución de trabajo (1L) se prepara diluyendo la solución stock 20X en agua y añadiendo 2 mL de MgCl₂.

3.1.4. Enzimas de restricción

- **S1 nucleasa** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)-
- **I-CeuI** (*New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU*)
- **EcoRI** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)
- **HindIII** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)
- **XbaI** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)
- **PstI** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)
- **TaqI** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)
- **HaeIII** (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)

3.1.5. Marcadores de peso molecular

Usados en electroforesis de corriente continua:

- **100 pb** (100-1500 pb); **20 pb** (20-500 pb); **λ -EcoT14 I/Bgl II digest** (60-2392 pb) (*Takara Bio Inc, Shiga, Japón*)

Usados en electroforesis de campo pulsante:

- **Lambda Ladder PFG Marker** (48,5-1000,18 kb) y **Low Range PFG Marker** (0,13-194 kb) (*New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU*)

3.1.6. Vectores de clonación

- **pBGS18**: 4336 pb (con resistencia a kanamicina y MCS con los sitios de restricción: *EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, SbfI, PstI, SphI, HindIII*). Secuencia nucleotídica obtenida durante esta tesis (ver anexos 7.2.).
- **pGEM[®]-T**: 3015 pb (con resistencia a ampicilina y MCS con los sitios de restricción: *Apal, AatII, SphI, BstZI, NcoI, BstZI, NotI, SacII, EcoRI, SpeI, EcoRI, NotI, BstZI, PstI, Sall, NdeI, SacI, BstXI, Nsil*) (*Promega, Madison, WI*)

3.1.7. Cepas receptoras y de referencia

- ***E. coli* DH5 α**
- ***E. coli* KZM120** (resistente a kanamicina, Δ *acrAB*)
- ***E. coli* BM21R**, resistente al ácido nalidíxico y rifampicina, con actividad fermentadora de lactosa y curada de plásmidos, derivada de la estirpe *E. coli* K12

Tabla 7. Cepas de referencia.

Sensibilidad a antibióticos	Sensibilidad a biocidas
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 10536
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 6234
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 13311
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538
	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC® 10541
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 15442
	<i>Lactobacillus brevis</i> DSM 6235

3.1.8. Kits comerciales

Tabla 8. Kits comerciales.

Nombre del kit	Proveedor
Genomic DNA kit	Qiagen GmbH, Hilden, Alemania
Plasmid MiniPrep, Midi, Maxi	Qiagen GmbH, Hilden, Alemania
RNeasy kit	Qiagen GmbH, Hilden, Alemania
LaTaq	Takara Bio Inc, Shiga, Japón
PCR clean up kit	Promega, Madison, WI
Amplitaq Gold	Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU
EcoTaq y rTaq	Ecogen, Madrid, España; Takara Bio Inc, Shiga, Japón
GoTaq Flexo DNA Polymerase	Promega, Madison, WI
QIAquick PCR®	Qiagen GmbH, Hilden, Alemania
ExoSAP-IT® purification kit	USB Corp., Cleveland, OH, EEUU
Ambion® DNase Turbo	Life Technologies, Carlsbad, California
DNA-free™ Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU
High Capacity RNA to cDNA kit	Life Technologies, Carlsbad, California
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU
Gene Images Alkphos Direct Labelling system	GE Healthcare Life Sciences Amersham, Uppsala, Suecia
CDP-star Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences Amersham, Uppsala, Suecia

3.2. AISLADOS BACTERIANOS ESTUDIADOS

Se estudiaron 948 aislados clínicos de diferentes especies (575 *E. coli*, 116 *K. pneumoniae*, 7 *K. oxytoca*, 55 *Enterobacter* spp., 6 *S. enterica*, 4 *Citrobacter* spp., 56 *E. faecalis*, 53 *E. faecium*, 32 *Listeria* spp.) identificados en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal desde 1988 a 2011. Se incluyeron además 901 aislados de *S. enterica* recogidos en Europa entre 1999 y 2003 por la empresa Quotient Bioresearch (Fordham, UK), colaborador del consorcio europeo BIOHYPO, y aislados de *E. coli* obtenidos en Francia (n=17), Kuwait (n=9), Suiza (n=7), Canadá (n=4) y Portugal (n=4), identificados entre 2001 y 2005. Las cepas aisladas fuera de España son

representativas de sus correspondientes áreas geográficas, bien por haber causado brotes epidémicos o bien por haber sido los primeros aislados con un mecanismo de resistencia emergente descrito en dicha zona.

Los aislados de enterobacterias se categorizaron en productores o no de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) o carbapenemasas (Tabla 9).

Tabla 9. Especies bacterianas estudiadas y presencia de BLEE.

Espécie	N	No-BLEE ^a	BLEE ^b
<i>E. coli</i>	575	313	232
<i>K. pneumoniae</i>	116	26	90
<i>K. oxytoca</i>	7	-	7
<i>Enterobacter</i> spp.	55	7	48
<i>Salmonella</i> spp.	907	901	6
<i>Citrobacter</i> spp.	4	1	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	56	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	53	-	-
<i>Listeria</i> spp.	32	-	-
Total	1849	1292	386

^a Estos aislados incluían cepas de origen clínico (C-noBLEE) y comunitario (V-noBLEE): i) C-noBLEE, aislados responsables de infecciones hospitalarias (Hospital Ramón y Cajal) en el mismo periodo de tiempo (n=140) y aislados de infecciones urinarias (n=171); ii) V-noBLEE (n=36), aislados de heces de voluntarios sanos residentes en Madrid (obtenidos en 2001) sin contacto previo con el hospital y sin antibióticos en los tres meses previos a la toma de la muestra (276), iii) otros no-BLEE, aislados de *Salmonella* recopilados dentro del consorcio europeo BIOHYPO.

^b Los aislados productores de BLEE/carbapenemasas han sido descritos en diferentes publicaciones e incluyen BLEE tipo TEM (277), SHV, CTX-M (-1, -3, -5, -9, -10, -14, -15, -32 (227,228,278-280); OXA-30 y carbapenemasas VIM-1 (281) y KPC (282). Algunos de los aislados productores de CTX-M-15 fueron obtenidos en otros países, como Francia (n=17), Kuwait (n=9), Suiza (n=7), Canadá (n=4), Portugal (n=4), identificados entre 2001 y 2005. Estos fueron representativos de sus correspondientes áreas geográficas, por haber causado brotes epidémicos o por haber sido los primeros en describirse en estos países.

La determinación de sensibilidad a biocidas se realizó en aislados clonalmente no relacionados para evitar sobrerrepresentación de clones pandémicos como *E. coli* B2 ST131, *E. coli* D ST405, *E. coli* A ST10, o *K. pneumoniae* ST11.

Los aislados de *Enterococcus* spp. estudiados incluyeron aislados de diferentes orígenes (animales de consumo, aguas de efluentes, humanos sanos y pacientes hospitalizados) obtenidos en distintos países de la Unión Europea y representativos de los principales clones de *E. faecalis* (CC2, CC9, CC21 y ST16) y *E. faecium* (CC17, CC5, CC94).

Para la obtención de mutantes se han seleccionado tres aislados de 3 especies de la familia de las Enterobacterias con gran sensibilidad a biocidas y antibióticos (Tabla 10).

Tabla 10. Características epidemiológicas y de sensibilidad de los aislados bacterianos usados para la obtención de mutantes a biocidas.

Especie	Cepa	Origen	G.F.	TRI		BKC		CHX		NaOCl		Resistencia Ab mg/L
				CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
<i>E. coli</i>	HEC30	HC	B2 ₃	0,06	0,5	16	16	8	8	65536	65536	Amp, Sul, Str
<i>K. pneumoniae</i>	39.11	ITU	Kpl	0,5	2	16	16	32	32	65536	131072	Amp, Fos
<i>S. enterica</i>	SL1344	-	-	0,03	1	16	16	16	16	65536	65536	-

Abreviaturas: G. F., Grupo Filogenético; Ab, antibiótico; HC, hemocultivo; ITU, Infección del tracto urinario; TRI, Triclosan; BKC, Cloruro de benzalconio; CHX, clorhexidina; NaClO, Hipoclorito de sodio; Amp, Ampicilina; Sul, Sulfametoxazole y Str, Estreptomocina.

3.3. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La identificación de las cepas y la determinación de su sensibilidad a distintos antibióticos se realizó con el sistema semiautomático PASCO (Difco, Detroit, MI, EEUU) hasta finales del año 1999 y con el sistema semiautomático WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid, España) a partir de enero de 2000. El inóculo utilizado (5×10^4 UFC/mL) es el recomendado por el CLSI, realizándose la lectura de los paneles tras 18h de incubación a 35°C.

El método MALDI-TOF MS usando el espectrofotómetro de masas Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania) con los programas de software FlexControl 3.0 y MALDI BioTyper 2.0 y 3.0 fue utilizado para la identificación de la especie bacteriana. En este caso, se emplea una pequeña cantidad de suspensión bacteriana preparada extemporáneamente, picando una colonia crecida en placa de agar rico (LB o sangre) en 0,7 µl de una matriz.

3.4. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS (BIOCIDAS Y ANTIBIÓTICOS)

Las pruebas de sensibilidad permiten inferir la actividad *in vitro* de antibióticos y biocidas y establecer la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. La sensibilidad a antimicrobianos se determinó preliminarmente utilizando los sistemas semiautomáticos comerciales de microdilución PASCO (Difco, Detroit, MI) y WIDER (Fco Soria Melguizo, Madrid, España). La determinación de sensibilidad a antibióticos y biocidas en la colección de estudio se llevó a cabo por las técnicas de difusión en agar (disco-placa y E-test) y de dilución (microdilución en caldo y dilución en agar).

3.4.1. Antibióticos y biocidas

La sensibilidad a cuatro biocidas representativos de distintas familias químicas con diferentes mecanismos de acción: *triclosan*, *cloruro de benzalconio*, *clorhexidina* e *hipoclorito de sodio* fue analizada por la técnica de microdilución en caldo siguiendo las normas del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (283). Las *soluciones de biocidas* fueron preparadas extemporáneamente usando el medio en caldo MH como diluyente (Tabla 5 en 3.1.2 Reactivos). Se descartaron las soluciones no usadas en el día de trabajo.

La sensibilidad a 23 antibióticos fue analizada por las técnicas de difusión en agar (disco) siguiendo las especificaciones de CLSI (283) o tiras en gradiente (Etest) siguiendo las instrucciones del fabricante (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Los antibióticos pertenecían a las familias de beta-lactámicos (ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, cefuroxima, cefepima y amoxicilina-ácido clavulánico), quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino), macrólidos (eritromicina), aminoglicósidos (amikacina, apramicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina, espectinomicina, estreptomina), tetraciclinas (tetraciclina), cloranfenicol, sulfonamidas (sulfizoxazol) y trimetoprim. Las soluciones de antimicrobianos se prepararon siguiendo las normas descritas por CLSI (Tabla 5) (284). Los rangos de concentración de antimicrobiano utilizados aparecen en la Tabla 5 (ver 3.1.2. Reactivos).

3.4.2. Técnicas utilizadas

Las técnicas de sensibilidad permiten determinar valores de **concentración mínima inhibitoria - CMI** - y de **concentración mínima bactericida - CMB** - mediante el examen visual del crecimiento bacteriano, midiendo halos de inhibición (en el caso de los discos o tiras de Etest) o el crecimiento a diferentes concentraciones de antimicrobiano (microdilución en caldo y dilución en agar). La CMI se define como el valor de menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible del microorganismo estudiado y la CMB, como el valor de menor concentración de antimicrobiano que causa la muerte del microorganismo, siendo el valor correspondiente a la concentración inicial de antimicrobiano donde no haya crecimiento al reinocularse en medio sin antimicrobiano. La CMB se evaluó por microdilución en caldo tras la determinación de la CMI, inoculando 10 µl de los pocillos no crecidos en medio sin antimicrobiano.

Los inóculos utilizados en todas las técnicas de determinación de sensibilidad fueron preparados a partir de una *suspensión bacteriana* de una colonia crecida en placa de medio no selectivo O.N. en 2 mL de solución salina (NaCl 0,85%), correspondiente a 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensión se diluyó 1:100 o 1:10 en caldo MH o salino, respectivamente, para obtener un inóculo de aproximadamente 1×10^6 - 1×10^7 UFC/mL, dependiendo de si el método de determinación fue microdilución en caldo o en agar. Los inóculos se usaron en ambiente estéril en los 15 minutos siguientes a su preparación. El medio de cultivo utilizado para la determinación de la sensibilidad fue el caldo MH con cationes ajustados.

Método de difusión en agar: disco -placa y tira de E-test

El método de difusión en agar utiliza, bien discos de papel impregnados de antimicrobiano a una determinada concentración (también llamado “difusión en disco” o “técnica de Kirby y Bauer”), o bien tiras de plástico impregnadas de antibiótico a un rango de concentración creciente y variable según el agente antimicrobiano (Epsilon test o “E-test”) que son depositados en la placa inoculada previamente con la suspensión bacteriana a 0,5 McFarland en solución salina al 0,85%. El uso de discos nos da una información semicuantitativa clasificada en las categorías de sensibilidad (S), sensibilidad intermedia (I), o resistencia (R) en función del diámetro del halo de inhibición del crecimiento (en mm) frente a un antimicrobiano siguiendo las normas establecidas por el CLSI (283). El diámetro de la zona de inhibición se correlaciona con

los valores de CMI determinados a partir de técnicas estándar. Las tiras de Etest dan información cuantitativa de la CMI (mg/L) que corresponde al valor que aparece en el punto de intersección del halo de inhibición del crecimiento bacteriano de forma elipsoidal (de ahí el nombre de la técnica, Epsilon test o Etest) con la tira. Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Método de microdilución en caldo

Es un método de determinación cuantitativa de la CMI. Se emplearon placas de 96 pocillos (12x8), las cuales permiten evaluar 10 concentraciones de antimicrobiano para 8 cepas, dejando dos columnas como controles, uno positivo (de crecimiento sin antibiótico) y otro negativo (ausencia de crecimiento sin inóculo). El volumen final en cada pocillo fue 100 μ l, correspondiendo 50 μ l a la dilución de antimicrobiano y 50 μ l a la suspensión del inóculo bacteriano.

Primero, se dispensó 50 μ l de caldo MH en toda la placa excepto en la columna 1. En las columnas 1 y 2 de la placa se dispensó la solución stock de antimicrobiano (2x). Empezando en la segunda columna se homogenizó con la pipeta multicanal, pipeteando varias veces, y haciendo diluciones secuenciales de 50 μ l hasta la columna 12, donde se desecharon 50 μ l después de homogenizar.

Al inocular en cada pocillo 50 μ l de la suspensión bacteriana a estudiar, se hizo una dilución 1:2 y el inóculo final se quedó en 5×10^5 UFC/mL/pocillo. La inoculación de las placas de 96 pocillos se hizo vertiendo la suspensión bacteriana en una placa de petri estéril y dispensándola con una pipeta multicanal (P200) en los pocillos, fila a fila empezando por la parte izquierda. En cada serie se incluyeron en las placas, cepas de referencia como controles (Tabla 11). A pesar de que los valores de CMI y CMB a los biocidas de estas cepas no fueran conocidos, sirvieron de controles de reproducibilidad de los experimentos (Tabla 11).

Se elaboró una plantilla de la placa de 96 pocillos con las concentraciones de antimicrobiano, que se usó como guía para dispensar el antimicrobiano y para registrar los resultados de crecimiento.

Método de dilución en agar

Se preparó y autoclavó el volumen necesario de agar MH. En cada placa Petri se echaron 2 mL de la correspondiente dilución (10X) del antibiótico y se completó con 18

mL de agar MH, previamente enfriado a +- 50°C con la ayuda de un dispensador autoclavado (2x 9 mL), homogenizando. Las placas se podían usar en el día o guardarse en nevera hasta 5 días.

Para la inoculación se empleó un replicador de Steers de 32 inoculadores (pinchos), que dispensan gotas de 1-2 µl de cada suspensión bacteriana (aproximadamente 5 mm de diámetro), de tal forma que el inóculo final depositado en la placa era de aproximadamente 1x10⁴ UFC/mL. Los pinchos del inoculador se sumergían en alícuotas de los inóculos bacterianos y se empezaba por inocular las placas de menor concentración de antibiótico, asegurándose de que la gota de cada pincho caía en la placa. Por cada serie de antibióticos evaluados, se usaron al menos 2 cepas de referencia y una placa sin antibiótico como control del crecimiento bacteriano. Por cada serie de replicadores se hizo una plantilla con las posiciones de las cepas (30 cepas + 2 cepas de referencia).

Las placas se incubaron O.N. a 37°C, en torres de no más de 4-5 placas para evitar diferencias de temperatura.

Tabla 11. Valores de CMI y CMB en mg/L de las cepas de referencia.

Cepas		Triclosan		Clorhexidina		Cloruro de benzalconio	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. coli</i>	ATCC10536	0,06-0,12	0,5-1	1-4	1-16	4-16	8-16
<i>E. coli</i>	ATCC25922	0,5		2		1	
<i>E. cloacae</i>	DSM6234	0,06-0,12	1	2-4	8	8-32	8-32
<i>S. aureus</i>	ATCC6538	≤0,015	0,03-0,12	0,12	4	0,5	2-8
<i>E. hirae</i>	ATCC10541	8-16	16	4-16	16-32	2	8

Se utilizaron como valores de referencia, los valores de CMI y CMB para antibióticos de las cepas control recomendados por el CLSI. Para biocidas, los determinados por el consorcio BIOHYPO durante la realización de esta tesis.

Para las pruebas de sinergia entre distintos agentes β-lactámicos se utilizaron discos de cefotaxima, ceftazidima y una combinación de amoxicilina y ácido clavulánico en proporción 2:1.

3.4.3. Determinación de la actividad de bombas de eflujo

Se inoculó un 4% (120 μ l) de inóculo crecido O.N. de cada transformante con *qac* en 3 mL de caldo LB precalentado. Cada inóculo se incubó con 0,5 mM de IPTG (15 μ l) a 37°C, con agitación de 150 rpm durante aproximadamente 2h, hasta obtener una DO_{600} de 0,4-0,6. Después se centrifugaron los cultivos a 6000 \times g, 10 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 3 mL de PBS (0,1 M pH 7,2). Se midió la DO_{600} de una dilución 1:10 en PBS 1x y se ajustó la absorbancia de cada muestra con PBS a 0,3 en un volumen de 4 mL.

El control sin actividad de eflujo consistió en células muertas (500 μ l de cultivo O.N. hervido durante 5 min). Esta muestra emitió mayor fluorescencia debido a la ausencia de actividad de eflujo y unión del BrEt al ADN. Se usó una placa de 96 pocillos de plástico negro (Nunc 96-well, poliestireno negro con tapa, Ref.165305) que se inoculó con las suspensiones bacterianas diluidas en un volumen final de 200 μ l. Para cada cepa, se inocularon 9 pocillos con los siguientes volúmenes de suspensión bacteriana: 3 pocillos con 200 μ l, 3 pocillos con 176 μ l (para permitir añadir el volumen de inhibidor de bomba de eflujo) y 3 pocillos con 180 μ l (a los cuales se añadió bromuro de etidio en la concentración final de 1 mg/L). A los pocillos con 176 μ l de suspensión bacteriana se añadió 4 μ l de la solución stock de inhibidor de la bomba de eflujo (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona- CCCP) para una concentración final de 100 μ M. Inmediatamente antes de empezar el ensayo, se añadió 20 μ l del stock de BrEt a 10 mg/L en los pocillos apropiados. Se usó PBS (200 μ l) y PBS con BrEt (180 μ l +20 μ l) por triplicado como controles. La fluorescencia se midió cada minuto durante 30 min, a temperatura ambiente en el aparato Tecan M200 Infinite (Tecan, Männedorf, Switzerland) con largo de onda de excitación y emisión de 530 y 585 nm, respectivamente.

Se representó gráficamente la fluorescencia (media de las réplicas técnicas realizadas para cada condición, restada del valor de fluorescencia de los controles PBS y PBS + BrEt) en presencia o ausencia de inhibidor para cada muestra en función del tiempo(285,286).

3.5. CRECIMIENTO BACTERIANO Y COSTE BIOLÓGICO

El **crecimiento bacteriano** se determinó mediante: i) recuento directo del número de unidades formadoras de colonias, ii) medida de la densidad óptica a 600 nm o iii) medida de la respiración celular.

El crecimiento bacteriano hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo y no a su aumento de tamaño. El incremento en el número de células da lugar a la formación de colonias o poblaciones. El tiempo necesario para duplicar el número de células de una población se llama *tiempo de generación*, y al igual que la *tasa de crecimiento* o cambio en el número de células por unidad de tiempo, depende de las condiciones genéticas y de los factores nutricionales.

La curva de crecimiento bacteriano tiene 4 fases:

- 1) fase lag, fase de latencia o período de adaptación
- 2) fase exponencial, fase log o logarítmica
- 3) fase estacionaria
- 4) fase de muerte

En la fase exponencial las células empiezan a dividirse de forma constante y la actividad metabólica es máxima. El crecimiento bacteriano sigue una progresión geométrica durante la cual se definen diferentes índices como: i) el *tiempo de generación* (δ) -tiempo determinado en el que el número de individuos se duplica, ii) el *número de generaciones* (n) que es igual al tiempo transcurrido (t) por δ , iii) el *número de bacterias* (N) al cabo de un número de generaciones (n) según la ecuación: $N = N_0 \times 2^n$ siendo N_0 el número de células en el momento actual.

El **coste biológico** es un parámetro relativo evaluado, bien de forma directa, en ensayos de competición donde las cepas compiten por el mismo espacio y nutrientes, o bien de forma indirecta, a través de la cinética de crecimiento individual determinando el parámetro de tasa de crecimiento $[(\ln DO_2 - \ln DO_1)/(t_2 - t_1)]$ durante la fase de crecimiento exponencial, además de los valores de tasa de crecimiento relativo y coste de *fitness* (287).

3.5.1. Cinética de crecimiento bacteriano basada en la medición de la densidad óptica

La determinación de la densidad óptica a 600 nm se realizó utilizando el sistema Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finland) y Tecan M200 Infinite (Tecan, Männedorf, Switzerland). Para estos ensayos se partió de 100 o 400 μ l de una dilución (1:1000) de 5 mL de cultivo bacteriano crecido O.N. en LB. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

3.5.2. Cinética de crecimiento bacteriano basada en la medición de la respiración celular- Microarrays fenotípicos (Biolog)

Los microarrays fenotípicos posibilitan el análisis cuantitativo simultáneo de múltiples fenotipos celulares. Son usados para identificar la función de un gen, validar una diana terapéutica o determinar la toxicidad de diferentes compuestos. Esta tecnología permite el análisis simultáneo de una batería de ensayos celulares utilizando programas bioinformáticos para un cribado de alto rendimiento (“high-throughput”).

El método se basa en la medición de la respiración celular, a través de una reacción química redox colorimétrica patentada por Biolog (Biolog, Hayward, California, EEUU) (288). Cuando la respiración celular es activa, el marcador tetrazolio se reduce originando un fuerte color, lo que indica un fenotipo fuertemente positivo. En cambio, si la respiración celular es lenta o no ocurre se origina menos o ningún color. Los experimentos de Biolog se han llevado a cabo utilizando suspensiones bacterianas ajustadas a 85% de transmitancia (T) (15 mL) en un fluido de inoculación (1X, IF-0a GN/GP Base, Biolog 74268) y realizadas a partir de cultivos incubados 18h a 30°C en agar BUG (Biolog). El fluido de inoculación para las placas PM11-20 se preparó mezclando 100 mL de IF-10a GN Base (1,2X) (Biolog 74264), 1,2 mL de Biolog Redox Dye A (100X) (Biolog 74221) y 0,6 mL de suspensión celular a 85% T, luego se añadió agua estéril hasta un volumen final de 120 mL. Se inocularon 100 µL de esta mezcla en cada pocillo de las placas PM. Posteriormente se incubaron las placas a 30°C en el lector Ominolog (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, Ca) que capta imágenes de la placa cada 15 min durante 72h. El análisis integrado de las curvas de cinética obtenidas permitió la identificación de diferencias fenotípicas entre las cepas (software Omnilog-PM OM_PM_109M). La concentración inhibitoria IC50 correspondió a la concentración del pocillo en el cual el área bajo la curva fue la mitad de su valor máximo en la serie de concentraciones utilizada. Un incremento de 33% (1:3) en el área bajo la curva de cinética de respiración se consideró como diferencia fenotípica significativa entre cepa salvaje y mutante. Las medidas se realizaron por duplicado y la media de la señal fue calculada en unidades arbitrarias para cada replica.

3.6. SELECCIÓN DE MUTANTES A BIOCIDAS Y/O ANTIBIÓTICOS

3.6.1. Generación de mutantes

La estrategia de obtención de mutantes aparece representada en la Figura 7. Las alícuotas de 100 µl de cultivos O.N. a 37°C en caldo LB suplementado o no con 0,5X CMI a los biocidas/antibióticos, fueron sembradas en placas de LB agar suplementadas con triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina, ampicilina (en el caso de *S. enterica* SL1344), ceftazidima o ciprofloxacino, en un rango de concentración variable de entre 2 y 33X la CMI correspondiente (Tabla 12), las cuales se incubaron durante 7 días a 30°C (Figura 7). La cepa de *E. coli* no fue seleccionada en ampicilina porque presentaba CMI >256mg/L.

Además se hizo un recuento de las células viables presentes en los cultivos líquidos iniciales y se registró el número de colonias crecidas en cada placa. La frecuencia de mutación se calculó dividiendo el número de UFC/mL de la placa de selección entre el número de UFC/mL de células viables del inóculo.

Para cada condición experimental, se seleccionaron 3 colonias de mutantes crecidos en placa que fueron congelados en glicerol al 20% y conservadas para un posterior análisis. Las tasas de mutación fueron calculadas según la siguiente fórmula:

$$\text{n.º UFC}_{\text{mutante}} / \text{n.º UFC}_{\text{cepa salvaje}}$$

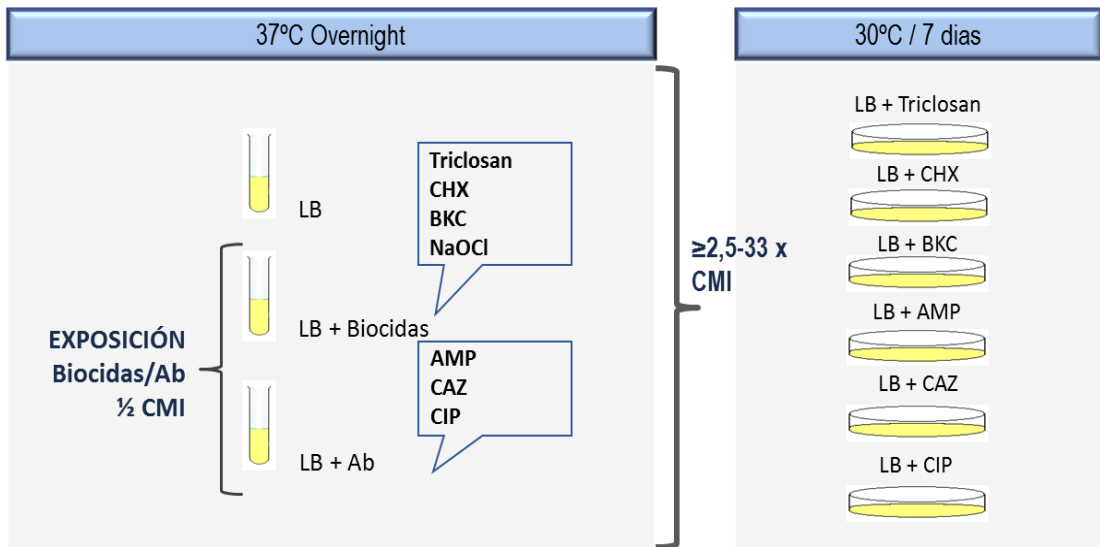


Figura 7. Metodología empleada para la selección de tolerantes a biocidas y/o antibióticos.

Tabla 12. Concentraciones de biocidas y/o antibióticos en mg/L, utilizados en la selección de mutantes.

		Concentraciones de selección de mutantes		
		HEC30	39.11	SL1344
TRI	Caldo	0,03	0,12	0,03
	Agar	1; 1,5 (25xCMI)	1,5 (3xCMI)	1 (33xCMI)
CHX	Caldo	2	8	8
	Agar	32 (4xCMI)	100 (3xCMI)	64; 100 (4-6xCMI)
BKC	Caldo	4	4	8
	Agar	64 (4xCMI)	32; 64 (2-4xCMI)	64; 100 (4-6xCMI)
NaClO	Caldo	16384	16384	16384
	Agar	-	-	-
Amp	Caldo	0,5	0,5	0,5
	Agar	-	-	4 (2,7xCMI)
CAZ	Caldo	0,125	0,19	0,25
	Agar	4 (16xCMI)	4 (10,5xCMI)	4 (8xCMI)
CIP	Caldo	0,015	0,015	0,015
	Agar	0,12 (5xCMI)	0,12 (2,5xCMI)	0,12 (3,8xCMI)

3.6.2. Caracterización de los fenotipos de mutantes a antimicrobianos: Microarrays fenotípicos (Biolog)

La *sensibilidad* a 240 compuestos antimicrobianos (PM11-PM20) y la *actividad metabólica* frente a 192 substratos (PM1 y PM2A) como únicas fuentes de carbono fue estudiada utilizando microarrays fenotípicos basados en la tecnología Biolog (para más detalles del método ver apartado 3.5.2).

La sensibilidad a cada compuesto se analizó para cuatro concentraciones subinhibitorias en placas selladas con membranas permeables al gas (Breath-Easy, Diversified Biotech, Boston, MA). La actividad metabólica de los mutantes y sus respectivas cepas salvajes se evaluó para substratos de las rutas metabólicas más importantes, estudiándose cada uno de ellos como única fuente de carbono. En cada placa multipocillo se utilizó una concentración de sustrato de aproximadamente 10 mM en el fluido de inoculación nombrado.

Este estudio se hizo en colaboración con el grupo del Doctor Carlo Viti de la Universidad de Florencia, Italia, dentro del consorcio europeo del proyecto BIOHYPO (FP7 KBBE-2008-2-4-02) del VII programa marco.

3.6.3. Análisis de mutaciones en *fabI*

La modificación de la proteína transportadora enoil acil reductasa que actúa en la ruta de síntesis de ácidos grasos constituye uno de los principales mecanismos de resistencia a TRI.

Parte de la secuencia del gen *fabI* (759 de 788 pb) fue amplificada y secuenciada en mutantes de *Ec* (n=3), *Kp* (n=3) y *Sal* (n=4) con diferentes valores de CMI al TRI, y en sus correspondientes cepas parentales. Los cebadores FabIF-5' ATGGGTTTTCTTTCCGGTAAG 3' (posición 1-21 pb) y FabIR-5' AATGCTGAANCCGCCGTCAA 3' (posición 759-740 pb fueron diseñados usando la secuencia consenso de *fabI* de *E. coli*, *K. pneumoniae* MGH 78578 y *S. enterica* SL1344 (Números acceso GenBank M97219, CP000647, FQ312003, respectivamente). Se registraron las mutaciones y cambios aminoacídicos en las secuencias obtenidas según el fenotipo de sensibilidad a TRI.

3.7. TÉCNICAS MOLECULARES DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: ADN Y ARN

3.7.1. Extracción de ADN genómico, ADN plasmídico y ARN

La extracción de ADN genómico o plasmídico se hizo por técnicas de extracción convencionales o utilizando kits comerciales. Las técnicas de extracción convencionales utilizan como agentes líticos el calor (*boiling*), soluciones alcalinas y/o detergentes, mientras que los kits comerciales combinan además el uso de columnas específicas de purificación de ADN genómico o plasmídico. Estos últimos son de mayor rendimiento y permiten obtener ADN más puro y estable.

ADN genómico

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante “boiling” o utilizando columnas específicas de sílice-gel del kit comercial DNeasy Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). En el primer caso, se obtuvo el ADN a partir del sobrenadante de una suspensión bacteriana en 300 µl de agua hervida a 100°C durante 10 minutos y centrifugada a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. La extracción de ADN utilizando kits comerciales se realizó a partir de una suspensión de células, tomadas de colonias bacterianas, en tampón de lisis, con un tratamiento lítico con proteinasa K (20mg/mL). El sobrenadante obtenido tras centrifugación se pasó por una columna de sílice a la que el ADN se une específicamente. Finalmente, se realizó el lavado de los contaminantes

presentes (proteínas o inhibidores enzimáticos) y la elución del ADN purificado con una solución de bajo contenido en sales (TE) o agua.

La extracción de ADN genómico “*in situ*” consiste en la incorporación de las células bacterianas en moldes de agarosa. La metodología utilizada se basa en el protocolo estándar original del manual Cold Spring Harbour, y ocasionalmente, también se utilizó un protocolo de preparación rápido (289,290). Se inoculó una colonia en caldo LB y se incubó a 37°C durante 18h. Posteriormente, se centrifugaron los tubos de cultivo a 6.000 r.p.m. y se lavaron las células con una solución de PIV (10mM Tris-HCl pH7,6 + 1M NaCl). A esta suspensión de células se le añadió un volumen de agarosa al 1,6% (agarosa D-5, Laboratorios Conda S.A., Madrid, España) en proporción 1:1 con el cuidado de lograr una mezcla homogénea, que se dispuso en pequeños moldes paralelepípedos. Tras la solidificación de los bloques de agarosa durante 15-20 min, se procedió a la lisis de las células utilizando una solución de 6mM Tris-HCl (pH7,6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH7,5), 0,5% Brij58, 0,2% desoxicolato, 0,5% de lauroil sarcosina de sodio (Sarcosyl), 20µg/mL ARNasa y 1mg/mL de lisozima durante 18h. La desproteización se llevó a cabo con una solución compuesta por 0,5M EDTA (pH9.0), 1% Sarkosyl y 50µg/mL de proteinasa K (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU) en baño a 50°C durante 18h. Por último, se realizaron 3-4 lavados de los bloques de agarosa con una solución de TE, el primero en el baño a 50°C y luego a temperatura ambiente con agitación durante 5-15 min. En el protocolo rápido, los pasos de lisis y desproteización ocurren simultáneamente, utilizando una solución de 50mM Tris, 50mM EDTA, 1% N-laurilsarkosine y 0,1mg/mL proteinasa K, pH=8 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU) durante un periodo de incubación de 18h a 54°C.

ADN plasmídico

La extracción de plásmidos de tamaño comprendido entre 2 a 150kb se llevó a cabo utilizando los **métodos de lisis alcalina de Birnboim y Doly**. El método de lisis alcalina de Birnboim y Doly se basa en la diferente resistencia del ADN plasmídico y del ADN cromosómico al pH básico (40). La utilización de una solución de hidróxido de sodio 0,2N y del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% provoca la lisis celular y la desnaturalización del ADN plasmídico y cromosómico. La neutralización posterior con acetato potásico (3M, pH=5) permite que el ADN plasmídico vuelva a su configuración covalente circular cerrada, y que por lo tanto permanezca soluble mientras el ADN cromosómico y las proteínas precipitan en un complejo formado por potasio y SDS que se elimina por centrifugación. El ADN presente en el sobrenadante se purifica con una

solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y con una solución de cloroformo. A continuación, el ADN se recupera tras una primera precipitación del sobrenadante obtenido con etanol adicionado de acetato potásico (1:10) durante 30-90 minutos. Después, se concentra por precipitación con etanol al 70%, repitiendo este paso dos veces. Este método ha estado tradicionalmente limitado a la extracción de plásmidos de alto o medio número de copias y de peso molecular <50kb, con un rendimiento aproximado de 2-5µg de ADN. Las versiones comerciales del método de lisis alcalina utilizan volúmenes mayores y un paso de purificación posterior con resinas de intercambio iónico que llegan a un rendimiento de entre 100-150 µg de ADN. Se utilizaron los kits QIAprep Spin Miniprep kit, el QIAGEN Plasmid Midi kit y el QIAGEN Large Constructs kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania), que permiten la obtención de plásmidos de bajo número de copias y de alto peso molecular (hasta 150kb).

El **método Kado y Liu** permite la rápida extracción de plásmidos en su conformación covalente circular cerrada con un amplio rango de pesos moleculares y combinando un tratamiento a pH alto con una elevada T^a (55°C) para intentar reducir la cantidad de ADN cromosómico en la preparación final. Las proteínas residuales obtenidas en el proceso son eliminadas gracias a una extracción con fenol:cloroformo. Primero, se preparó una suspensión bacteriana en tampón TE a partir de un cultivo en placa de LB de 24h. A continuación, se añadió la solución de lisis (3% SDS, 50 mM Tris y 125 mM NaOH 2 N) incubándose a 55-60°C durante 3-4h. Posteriormente, se extrajo con fenol-cloroformo agitando hasta obtener una emulsión y se separó la fase superior por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 15 min. Finalmente, los plásmidos contenidos en la fase acuosa superior se separaron en un gel de agarosa mediante electroforesis en corriente continua (ver apartado 3.7.3.).

La visualización de plásmidos en un gel se puede realizar por el **método de Barton** que consiste en el análisis de ADN genómico por electroforesis de campo pulsado tras digestión con S1 nucleasa. El ADN cromosómico sufre una digestión selectiva y el ADN plasmídico súper enrollado se convierte en ADN lineal permitiendo que su migración en un gel de campo pulsado sea directamente proporcional a su tamaño, y por tanto, comparable con los marcadores de peso molecular utilizados(291).

ARN mensajero

Debido a la gran vulnerabilidad del ARN a degradarse por ARNasas, se requiere la utilización de guantes, la limpieza de la superficie y del material de trabajo con

detergente libre de ARNasas, el uso de agua libre de ARNasas en pequeñas alícuotas para evitar contaminación cruzada y la esterilización del material de plástico y cristal 2 veces consecutivas para la realización de los experimentos.

Tres réplicas biológicas de la cepa salvaje y de sus respectivos mutantes fueron crecidos, por duplicado, en 25 mL de caldo LB (matraz de 100 mL) hasta la fase exponencial y enfriados rápidamente en hielo. Se mezclaron los 5 mL de cada cultivo duplicado y se centrifugó a 8000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. El ARN fue aislado utilizando el kit RNeasy de Qiagen (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo consiste en una lisis por sonicación y homogenización en presencia de un agente altamente desnaturalizante que rompe los puentes disulfuro (buffer con β -mercaptoetanol) e inactiva las ARNasas, permitiendo la purificación de ARN intacto. Al añadir etanol y aplicar la muestra a una membrana de sílice provista por el kit, el ARN total se une a ésta mientras que los contaminantes se eliminan. Finalmente, el ARN es eluido de la membrana con 60 μ l de agua libre de ARNasas. Las moléculas de ARN purificadas son de 200 nucleótidos o más, produciéndose un enriquecimiento de ARN mensajero, ya que la mayoría de los ARN ribosómicos son de menos de 200 nucleótidos y por tanto, son selectivamente eliminados.

Para eliminar cualquier molécula de ADN, se trató la muestra con Ambion[®] DNasa Turbo (Life Technologies, Carlsbad, California). La presencia de ADN contaminante se averiguó por PCR amplificando un gen *housekeeping* (*gapA*). Las muestras de ARN con presencia de ADN fueron digeridas de nuevo con Ambion[®] DNasa Turbo y purificadas según el protocolo de *clean-up* del RNeasy kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania). La calidad y concentración del ARN fue medida en el espectrofotómetro microvolumen Nanodrop (ND-1000, Labtech).

3.7.2. Amplificación de ADN

La técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa) se utilizó para la detección e identificación de secuencias (apartado 3.9.), la tipificación molecular de ETH (apartado 3.11.) y la obtención de fragmentos para su posterior clonación (apartado 3.7.6.).

Las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., Minnesota, EEUU) utilizando controles de reacción positivo, negativo y blanco. Las condiciones y componentes de cada reacción variaron, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar. Se prepararon mezclas en un

volumen de reacción final de 50µl o 20µl que contenían los siguientes componentes: tampón de reacción (1X), MgCl₂ (1,5-2,5mM), dideoxynucleótidos (0,2 mM), cebadores específicos directo y reverso (1µM) y Taq polimerasa (1,5-2,5UI), con concentraciones variables dependiendo del grado de especificidad y del tipo de polimerasa usada.

Para la amplificación de secuencias de ADN menores de 3kb se usaron las siguientes condiciones de reacción: ciclo de desnaturalización a 94°C durante 10 min, 35 ciclos de amplificación a 94°C durante 1 min, *annealing* de 50-65°C durante 1-2 min y extensión a 72°C durante 1-3 min, seguido de un paso de extensión final a 72°C durante 10 min. Las polimerasas utilizadas fueron Amplitaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), EcoTaq (Ecogen, Madrid, España) y rTaq (Takara Bio Inc, Shiga, Japón). La enzima Amplitaq Gold es una polimerasa de alta fidelidad y especificidad que se activa solamente a temperaturas elevadas (“hot-start”), disminuyendo la formación de productos inespecíficos y aumentando el rendimiento. Por otra parte, las polimerasas EcoTaq (Ecogen, Madrid, España), rTaq (Takara Bio Inc, Shiga, Japón) y Taq fueron utilizadas cuando no se precisaba condiciones especiales ya que son compatibles con una gran variedad de reacciones de PCR y tienen un bajo coste (Promega, Madison, EEUU).

Para la amplificación de secuencias mayores de 3kb se utilizó la polimerasa Takara LA TaqTM (Takara Bio Inc, Shiga, Japón), una enzima de alta eficiencia y fidelidad que permite la amplificación de fragmentos de ADN de hasta 15kb. Las condiciones de reacción utilizadas fueron: un ciclo de desnaturalización a 94°C (1 min), 35 ciclos a 96°C (20s), 55-60°C (1 min) y 72°C (3-5 min), seguidos de un paso final de 10 min a 72°C. La adición ocasional de dimetilsulfóxido (DMSO) (5-10%), un agente desnaturalizante que permite una mejor separación de las cadenas de ADN, facilitó la amplificación de fragmentos grandes y su posterior secuenciación ya que reduce la formación de productos inespecíficos que se generan durante la reacción de PCR.

3.7.2.1. PCR en tiempo real cuantitativa para análisis de expresión génica

La PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) se usó para cuantificar la expresión de genes codificantes de subunidades formadoras de bombas de eflujo y reguladores de las mismas (*acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, *ramA* y *soxS*) utilizando como gen de referencia para la cuantificación relativa, el gen *housekeeping* que codifica la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*). La qRT-PCR se llevó a cabo en los sistemas 7500 y 7300 Fast Real-Time (Applied Biosystems, Carlsbad, California),

utilizando SYBR® Green master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, California) y 100 nM de cebadores específicos. Se utilizó el siguiente programa de ciclos: 94 °C X 15 minutos, 40 ciclos de 94 °C X 15 segundos, 56 °C X 30 segundos, 72 °C X 1 minuto y el paso final de extensión, 72 °C X 10 minutos. Se analizaron 50 ng de ADNc de 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas. Los cebadores empleados están listados en la Tabla 13. Dado que el SYBR Green se mantiene unido al ADN amplificado se determinaron las curvas de *melting* aumentando gradualmente la temperatura hasta la desnaturalización de las cadenas dobles de ADN del producto y posterior disociación del fluoróforo, que provoca la disminución de la fluorescencia. Este análisis permitió confirmar la especificidad de la RT-PCR, dado que se pueden detectar productos inespecíficos, como dímeros de los cebadores, amplicones inespecíficos o contaminación por ADN genómico que podría ser también amplificado.

La PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) posee amplio rango dinámico haciendo que una amplia gama de ratios de genes pueda analizarse con similar sensibilidad y especificidad. Tras realizarse la retrotranscripción, la señal final de la PCR depende de la eficiencia de la reacción de la transcriptasa inversa. Un buen diseño de los cebadores es esencial en la qRT-PCR. Habitualmente, estos deben tener entre 18-24 bases, lo cual proporciona temperaturas de alineamiento convenientes. Los amplicones, deben tener tamaño similar entre sí (entre 80 y 250 pb), una vez que diferencias de tamaño significativas originarían diferentes cantidades amplificadas distorsionando la cuantificación, al amplificarse menos eficientemente productos más grandes. Es importante ensayar las condiciones antes mediante PCR convencional, optimizando las temperaturas de alineamiento y la formación específica de cantidades similares de los amplicones de las distintas muestras a estudiar.

Tabla 13. Cebadores usados en la qRT-PCR.

Especies	Gen	Secuencia (5' - 3')	Tamaño amplicon (pb)	T ^a melting (°C)	T ^a annealing (°C)
<i>Ec, Sal, Kpn</i>	<i>acrB</i>	F: TTTGCGTGGGTGATCGC R: GTTATCGATACCGTTCATA	192	54 52	50
<i>Ec, Sal</i>	<i>acrF</i>	F: TGGCCATTATYCTGATGA R: GTTATCGATACCGTTCATA	179	50 52	48
<i>Kpn</i>		F: TTCATCGACCGGTCTTCG R: AGATTGTCGATGCCGTTT	208	56 54	52
<i>Ec, Kpn</i>	<i>acrD</i>	F: GTGCTGGCAATCCTGTT R: TATCGAGGCCGTCATAT	181	52 54	50
<i>Sal</i>		F: TCACCCATGAGAAAGACAAC R: AAGACGCGAGCTTCTTTAAT	195	52 52	50
<i>Ec, Sal</i>	<i>marA</i>	F: TCATAGCATTTTGGACTGG R: TTGCGCGATTTCCGTCAT	172	54 54	52
<i>Kpn</i>		F: AGCGCTCCGGTTACTCTAA R: GCTGCGACTCGAAACCATA	171	58 58	56
<i>Ec</i>	<i>soxS</i>	F: ATTGACCAGCCGCTTAACAT R: ACATAACCCAGGTCCATTG	197	58 56	
<i>Sal</i>		F: AACATTGATGTGGTGGCAAA R: TGCGATACATAGCCCAGGT	188	56 58	54
<i>Kpn</i>		F: TAGTCGCCAGAAAGTCAGG R: GAGAAGGTTTGCTGCGAGA	190	58 56	
<i>Sal</i>	<i>ramA</i>	F: GACCATTTCCGCTCAGGTTA R: GCCAGTTTTAGCTTCCGTTT	186	60 60	58
<i>Kpn</i>		F: CTGCAACGGCTGTTTTTACA R: ATTGAAGGTCCGGGTGAAG	180	58 58	56
<i>Sal</i>	<i>gapA</i>	F: GCTAACCTGAAATGGGACG R: GTCCTGGCCTTCGTATTTG	188	58 58	
<i>Ec</i>	<i>gapA</i>	F: GCTAACCTGAAATGGGACG R: GTCCTGGCCAGCATATTTG	189	58 58	56
<i>Kpn</i>	<i>gapA</i>	F: GAAAGGCGTTCTGGGTTAC R: GATGTGGGCAATCAGATCC	184	58 58	

3.7.3. Separación y purificación de ADN

La separación de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa de corriente continua o de corriente alterna.

Electroforesis en corriente continua

En esta electroforesis se aplica un campo eléctrico de corriente continua que permite separar fragmentos de ADN comprendidos entre 10pb y 50kb. No obstante, la

resolución para fragmentos mayores de 20kb es baja. Esta técnica se utilizó para la separación de fragmentos amplificados por PCR y la separación de plásmidos digeridos o sin digerir. Los pasos seguidos fueron:

a) Preparación de geles de agarosa. La agarosa utilizada fue D-1 Low EEO (Pronadisa, Madrid, España) que por su baja electroendósmosis (0,05-0,13%) permite una gran movilidad. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x a distintas concentraciones de agarosa dependiendo del tamaño del fragmento a separar (0,8%-2,0% peso/volumen). Para los fragmentos de tamaños comprendidos entre 1kb y 10kb se utilizaron geles de agarosa al 0,8% y para los de tamaño entre 100 pb y 1kb, geles al 2,0%.

b) Electroforesis. Los pocillos de los geles se cargaron con volúmenes variables de ADN (2-4 μ l en el caso de productos de PCR y 15-30 μ l para los plásmidos) mezclado con un volumen de tampón de carga de 2 a 5 μ l. La separación de los distintos fragmentos se realizó en una cubeta horizontal, con tampón TBE 0,5x a 100 V durante un tiempo variable: 30 min para los productos de PCR y 4h para la separación de ADN plasmídico. El tamaño de los fragmentos se infirió por comparación con las bandas de los marcadores de peso molecular usados.

Electroforesis en corriente alterna o electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Esta electroforesis utiliza un gradiente de corriente alterna que permite la resolución de moléculas de alto peso molecular (desde 20kb a 10Mb). Los distintos pulsos eléctricos que se producen permiten la reorientación y migración de los fragmentos según su peso molecular.

Los pasos previos a la separación son: la extracción de ADN *in situ* en bloques de agarosa (apartado 3.7.1.), la digestión con distintas enzimas de restricción dependiendo del tipo de estudio y la preparación del gel.

a) Preparación de geles de agarosa. Para la separación de los fragmentos de ADN, se cargaron los bloques de agarosa, previamente incubados con la enzima de restricción, en un gel de agarosa D5 (Pronadisa, Madrid, España) al 1,2% en TBE 0,5x. Las características de la agarosa utilizada permiten una separación óptima de fragmentos de ADN por PFGE, puesto que su bajo valor de electroendósmosis (<0,120) permite una mayor movilidad electroforética.

b) Electroforesis de campo pulsado (PFGE). La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, CA., EEUU), aplicando

las siguientes condiciones: 14°C, 6 V/cm² y condiciones de electroforesis distintas dependiendo del estudio: para la digestión con *XbaI* (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japón), 10-40 s, durante 24h; para la digestión con *I-CeuI* (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU), 5-25 s durante 23h seguido de una rampa de 60-120 s durante 10h; y para la digestión con S1 nucleasa (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japón), 5-25 s durante 3h y una segunda rampa de 30-45 s durante 12h.

Tinción y visualización

La visualización de los fragmentos separados por electroforesis se realizó por tinción de los geles con bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 µg/mL. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta.

Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con el equipo Gel Logic 100 Imaging System (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EEUU).

3.7.4. Purificación y secuenciación de ADN (de amplicones, clonajes y plásmidos)

La *secuenciación de plásmidos* se hizo dentro del consorcio europeo TROCAR del séptimo programa marco de la Unión Europea (TROCAR-FP7-HEALTH-F3-2008-223031) mediante la técnica de pirosecuenciación o secuenciación 454 por el uso de la tecnología 454 GS-FLX (Sistemas Genómicos; Valencia, España). La pirosecuenciación se basa en la detección del pirofosfato liberado en la síntesis de ADN cuando es incorporado un nucleótido específico. Este método permite la secuenciación a gran escala, aplicable a genomas completos. A diferencia del sistema de Sanger, capaz de resolver 67.000 bases cada hora, el método 454 puede determinar la secuencia de 20 millones de bases en 4,5 horas, lo cual abarata enormemente el coste.

En primer lugar, el ADN a secuenciar se fragmenta (aproximadamente de 200-800 pb) mediante un proceso físico conocido como “nebulización”, obteniendo una librería de pequeños fragmentos. A cada fragmento se añade dos pequeñas secuencias adaptadoras (adaptador A y B) en cada extremo. El adaptador B se encuentra biotinilado permitiendo la unión de los fragmentos a nano-esferas. Solo los fragmentos que contengan 2 adaptadores B se unirán por dos puntos. Los fragmentos de doble cadena unidos a estas esferas son sometidos a alta concentración de NaOH que provoca

desnaturalización en cadenas simples. Si el fragmento tuviese dos adaptadores B se separarían las cadenas pero ambas permanecerían unidas a las esferas. Como resultado de este proceso se liberan de las esferas los fragmentos de cadena simple que tienen un adaptador de cada clase con el B situado en el extremo 5' del fragmento, ya que los fragmentos complementarios a estos permanecerán unidos por el extremo 3' del adaptador B. Los fragmentos libres de cadena simple se unen a esferas con gran número de secuencias complementarias al del adaptador A; esta unión está optimizada para que solo un fragmento se una a cada esfera. Esas esferas se introducen en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera quede dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarios para la PCR. Tras una serie de ciclos de PCR, en cada esfera se genera un gran número de secuencias de doble cadena idénticas y unidas por el adaptador A. De nuevo, las esferas son sometidas a alta concentración de NaOH para separar las cadenas complementarias. Así cada esfera tiene adherido a su superficie un gran número de cadenas simples idénticas unidas por el extremo 3'.

Antes de empezar la secuenciación en sí misma se añaden cebadores complementarios al adaptador B en posición 5', ADN polimerasas y los cofactores necesarios para la síntesis de la cadena complementaria a los fragmentos unidos a las esferas. Las esferas se cargan en un dispositivo conocido como "PicoTiterPlate" que posteriormente se introduce en el secuenciador. La detección de la incorporación de un nuevo nucleótido se da gracias a una reacción de quimioluminiscencia. Lo que ocurre es una *cascada enzimática que empieza cuando la ADN polimerasa incorpora un nucleótido a la cadena creciente complementaria del ADN a secuenciar*. Para que esto suceda se va añadiendo a la "mix de PCR" los cuatro tipos de nucleótidos uno a uno. Si el nucleótido puesto en la solución no es el correcto este es eliminado por la enzima apirasa, pero si es el adecuado, *la reacción de síntesis libera un pirofosfato que se transforma en ATP por una sulfurilasa y la presencia de ATP hace que la luciferasa se transforme en oxiluciferina emitiendo luz*. Esta luminiscencia es la que indica cual de los nucleótidos se incorporó a la cadena.

3.7.5. Localización de genes en el ADN genómico

La localización cromosómica o plasmídica de genes de resistencia o bien de secuencias genéticas usadas en la clasificación de los elementos genéticos de transmisión horizontal se determinó por hibridación del ADN digerido con *I-CeuI* o S1 nucleasa con sondas específicas obtenidas por PCR. La enzima *I-CeuI* reconoce dianas de restricción de ADN cromosómico correspondientes a regiones específicas del operón 23S

de genomas bacterianos. Una sonda 16S rADN hibrida solamente con fragmentos de ADN cromosómico. La hibridación de la sonda 16S rADN y de la sonda del gen de interés en el mismo fragmento indica la localización cromosómica de ese gen. Cuando la hibridación de la sonda complementaria al gen de interés ocurre en bandas que no hibridan con la sonda 16S rADN indica que su localización es plasmídica. La S1 nucleasa digiere selectivamente el ADN cromosómico y convierte el ADN plasmídico superenrollado en lineal, así la hibridación de una sonda en uno de los fragmentos generados tras la digestión con S1 nucleasa es indicativo de localización plasmídica, además de indicarnos el tamaño de dicho plásmido.

El ADN genómico fue transferido por el método de Southern blot. El proceso incluye la *separación, transferencia y fijación del ADN* a una membrana, *marcaje de las sondas, hibridación del ADN* y *revelado*.

La *separación* de los fragmentos de ADN se realizó por electroforesis en corriente continua o por PFGE (ver apartado 3.7.3.). Después de la tinción y visualización del gel, se expuso 2 min a la luz ultravioleta y se desnaturalizó durante 90 min en una solución de NaOH 0,4 N. La *transferencia* a una membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare Bio- Sciences AB, Uppsala, Suecia) se realizó mediante el método Southern blot (289), durante 48h, utilizando NaOH 0,4 N como tampón de transferencia. Posteriormente, se hicieron lavados de 5 min con una solución de SSC 2x (Citrato sódico 30 mM, NaCl 0,3 M) y de 2 min con Tris-HCl 0,5 M, pH=7,0. La fijación de ADN se hizo por exposición a la luz ultravioleta durante 3 min. El marcaje de la sonda y la hibridación se realizaron con el kit AlkPhos™ siguiendo las indicaciones del fabricante (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). El *marcaje de las sondas* se hizo con ADN purificado a una concentración de 10 ng/μl, desnaturalizado por calor (95°C) durante 5 min y unido covalentemente a fosfatasa alcalina tras una incubación a 37°C durante 30 min. La *hibridación* se llevó a cabo con las sondas específicas obtenidas por PCR a una temperatura de 55-60°C durante 18h, utilizando el horno Techne HB-1 (Techne Ltd, Cambridge, RU). La *detección* de la señal se realizó mediante la adición de dioxetano (CDP-star Detection Reagent, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) sobre el que actúa la fosfatasa alcalina.

3.7.6. Clonación de genes en vectores de expresión

La clonación de genes en un vector incluye los siguientes pasos: *amplificación de ADN, ligación y transformación*.

La *amplificación* se realizó de acuerdo al apartado 3.7.2. Se insertaron sitios de restricción de enzimas también presentes en el sitio “polylinker” del vector de clonaje en los extremos de los cebadores (ver Tabla 14) para realizar la posterior ligación del fragmento en el vector. Pero además el uso de diferentes sitios de restricción en cada extremo permite la clonación direccional y la inserción del fragmento en fase con el marco abierto de lectura del operón de lactosa. Los oligonucleótidos, directo y reverso, hibridaron en una región distanciada entre 5 a 7 pb antes del codón de iniciación y entre 2 a 4 pb después del codón de terminación de los genes, respectivamente.

Tabla 14. Cebadores y condiciones utilizados para amplificar los diferentes genes *qac* y *sul*.

Cebadores	Secuencia (5'-3') ^a	Referencia GenBank	Posición	T ^a melting (°C)
qacI/F_PstF	<u>TACTGCAGCTTCATACCGTAGAGGAG</u>	AF205943 AF034958	1349-1366 2014-2031	54
qacI_EcoR	<u>ATTATGAATTCTTGTTAGATGCCAGCCC</u>	AF205943	1725-1709	52
qacF_EcoR	<u>ATTATGAATTCTGTTAGATGCCAACCCG</u>	AF034958	2389-2373	52
qacG_PstF	<u>TACTGCAGCGGAATCCATGGAGAAA</u>	AF327731	90-107	54
qacG_EcoR	<u>ATTATGAATTTCGAATGGTTAGATGCGAC</u>	AF327731	466-449	54
qacE_PstF	<u>TACTGCAGCCCTACACAAATTGGGAG</u>	U67194	33872-33888	54
qacE_EcoR	<u>CAGATGAATTTCGACTTGTTAGATGACTGAG</u>	U67194	34252-34234	54
qacK_PstF	<u>TACTGCAGCTTCGAATCATATTGGAGG</u>	EF522838	3648-3666	54
qacK_EcoR	<u>ATTATGAATTCATTGTTAGATGCCAGTGC</u>	EF522838	4026-4009	52
sul1F_HindIII	<u>TGTAAGCTTTGCTCGCCCGATCCCCAT</u>	GQ293500	11824-11842	60
sul1R_XbaI	<u>TGTTCTAGATTCGCGGAACCTGACCAG</u>	GQ293500	12742-12760	58
sul2F_HindIII	<u>TGTAAGCTTCCGTATGAGACTCATGCT</u>	JQ010984	39232-39215	54
sul2R_XbaI	<u>TGTTCTAGATAGAGAAATATCCCGAATG</u>	JQ010984	38349-38367	52
sul3F_PstF	<u>TACTGCAGCGTAAGTGATAATTAGTCAAT</u>	HQ875014	7418-7398	54
sul3R_EcoR	<u>ATTATGAATTCCAACCTTCAGAGCAAGTATAG</u>	HQ875014	6517-6536	56

^aLas bases nucleotídicas subrayadas corresponden a bases añadidas aleatoriamente para facilitar la restricción y las bases en negrita corresponden a los sitios de restricción de las enzimas empleadas.

El vector de expresión usado fue pBGS18 (4336 pb, KanR), de alto número de copias. Su secuencia nucleotídica se obtuvo durante esta tesis (ver anexos 7.2.).

La *ligación* se hizo tras la purificación del amplicón y posterior digestión con las endonucleasas correspondientes tanto del amplicón purificado como del plásmido vector, resultando fragmentos de ADN con extremos cohesivos que hibridan con las secuencias complementarias (amplicón/vector). Tras inactivar las enzimas de restricción

se llevó a cabo la ligación usando la T4 ADN ligasa, O.N. a 4°C. La *transformación de las construcciones de ADN* se hizo en células competentes de *E. coli* DH5α o *E. coli* KZM120 (KanR, Δ acrAB). La preparación de células competentes se realizó por el método de CaCl₂ para la transformación por choque térmico, o según el protocolo para la electroporación. Brevemente, se realizó un cultivo en 50 mL de caldo LB a 37°C hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5-0,7 y se procedió a un lavado de las células bien con CaCl₂ 0,1M a 4°C (choque térmico) o bien con agua (electroporación) y a una centrifugación posterior a 6000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se resuspendieron las células en un volumen, bien de CaCl₂ 0,1M o de agua, según el método de transformación a usar, correspondiente a una dilución 1:100 del cultivo inicial y se guardó esta suspensión en nevera O.N.. La transformación de los plásmidos recombinantes en células competentes se hizo mediante choque térmico o electroporación. El choque térmico fue realizado sobre una mezcla de 100 µl de células competentes (obtenidas por el método del CaCl₂) y aproximadamente 1ng de plásmido, incubada primero en hielo durante 20 min y posteriormente en baño a 42°C durante 90s. La electroporación se realizó en cubetas de electroporación de 0,2 cm conteniendo 40 µl de mezcla de células competentes (lavadas en agua) y 1ng de plásmido, a un voltaje de 2,5 kV durante un tiempo constante de aproximadamente 5ms. Finalmente, se añadió 1,5 mL de medio LB líquido a la mezcla y se incubó el cultivo en baño con agitación a 37°C durante 1-2h. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar suplementadas con kanamicina (50 o 150µg/mL, dependiendo si la estirpe era DH5α o KZM120, respectivamente), 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido-X-Gal (40 µg/mL) e isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido-IPTG (0,25 mM) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EEUU) para la detección de colonias azules o blancas.

Por último, en los transformantes positivos se secuenció la zona adyacente al “polylinker” de los plásmidos recombinantes para confirmar la presencia de los genes clonados y la ausencia de mutaciones en ellos.

3.8. EXPRESIÓN GÉNICA

3.8.1. Retrotranscripción

La retrotranscripción de ARN a ADN complementario (ADNc) se hizo empleando el kit de la transcriptasa reversa “High Capacity cDNA Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Primero, se preparó una mezcla con los componentes de la reacción al 2X: buffer, mix de dNTPs, cebadores aleatorios, agua libre de nucleasas y la retrotranscriptasa MultiScribe™. Una alícuota de

10 µl de la mezcla y 10 µl de la muestra de ARN previamente ajustada a la concentración de 10 ng/µl fue amplificada usando las siguientes condiciones: 25°C x 10 minutos, 37°C x 2h y 85°C x 5 minutos.

Este método se empleó para realizar posteriormente PCR en tiempo real cuantitativa (ver apartado 3.8.2.), o PCR semicuantitativa, con el fin de confirmar la expresión de genes clonados por PCR convencional.

3.8.2. RT-PCR cuantitativa

Las cantidades de ADNc amplificado fueron inferidas por el valor de límite del ciclo, C_T (“cycle threshold”). Los datos fueron normalizados teniendo en cuenta los valores C_T para el gen de referencia correspondiente y para el gen evaluado en la cepa salvaje. Se determinaron los valores promedio de los diferenciales de C_T y la cantidad de RNA se expresó según el método 2 delta-delta Ct que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control de acuerdo con la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (287).

3.8.3. Microarrays

En el seno del consorcio europeo BIOHYPO, en colaboración con el doctor Denis Grandgirard del Instituto de Enfermedades Infecciosas de Berna, Suiza, fueron analizados la cepa de *S. enterica* SL1344, 11 mutantes de la misma y 16 aislados de *S. enterica* naturales con reducida sensibilidad a biocidas. El array fue diseñado para cubrir el genoma completo de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium y una variedad de plásmidos de microorganismos gramnegativos disponibles en la base de datos de GenBank. El diseño de las sondas se hizo por CustomArray Synthesizer (CombiMatrix, Mukilteo, WA) teniendo en cuenta su especificidad, temperatura de *melting*, tamaño entre 35-40 pb bases, complejidad, estructura secundaria y contenido en GC. Se usó un total de 12005 sondas. El array contenía 326 sondas para el control de calidad que incluían sondas inespecíficas derivadas de secuencias de plantas, fagos y bacterias. En los chips había 148 puntos sin oligonucleótidos. Las pruebas de calidad fueron hechas de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Los datos de los microarrays fueron analizados usando diagramas de Venn para obtener información sobre los genes con expresión alterada en varias cepas.

3.9. ESTRUCTURA POBLACIONAL

La identificación de clones o grupos clonales fue investigada por las técnicas de electroforesis de campo pulsado (ECP) (ver apartado 3.7.1. y 3.7.3. para detalles de procedimiento), multilocus sequence typing (MLST) y determinación del grupo filogenético.

3.9.1. Electroforesis de campo pulsado (ECP)

La comparación visual de los patrones de ADN genómico digerido con una enzima de restricción adecuada, obtenidos por ECP aplicando los criterios estándar de Tenover *et al.* (292) permitió establecer cuatro categorías para definir la relación epidemiológica de los aislados: i) indistinguibles (sus patrones de restricción no presentan bandas de diferencia); ii) muy relacionados (sus patrones de restricción se diferencian en 2 o 3 bandas); iii) posiblemente relacionados (sus patrones de restricción dactilar difieren en 4-6 bandas); y iv) diferentes (la diferencia entre los perfiles es > 7 bandas).

3.9.2. MultiLocus Sequence Typing (MLST)

La identificación de secuencias tipo (ST) de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Esta técnica se basa en el análisis de secuencias intragénicas de ADN correspondientes a 7 genes que codifican enzimas metabólicas no sometidos a presión selectiva (genes "housekeeping") cuyos perfiles permiten detectar variantes alélicas que definen líneas clonales relativamente estables. Los siete genes considerados en el análisis de la especie *E. coli* y *K. pneumoniae* por MLST aparecen en la base de datos de las páginas web <http://www.mlst.net>, <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> y en la Tabla 15.

Las secuencias de cada uno de los *loci* fueron comparadas con las existentes en la base de datos centralizada (www.mlst.net). Se asignó a cada aislado un perfil de siete números que indica las variantes alélicas de los genes analizados y que se corresponde con una secuencia tipo (Sequence Type, ST).

Tabla 15. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* por MLST.

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones
MLST <i>E. coli</i>^a			
<i>adK</i> (583 pb)	<i>adK</i> -F <i>adK</i> -R	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG CCGTCAACTTTCGCGTATTT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>icd</i> (878 pb)	<i>icd</i> -F <i>icd</i> -R	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACAGGACG CAGCAGGATCTGTT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>purA</i> (816 pb)	<i>purA</i> -F <i>purA</i> -R	TCGGTAACGGTGTGTGCTG CATACGGTAAGCCACGCAGA	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>fumC</i> (806 pb)	<i>fumC</i> -F <i>fumC</i> -R	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC GTACGCAGCGAAAAAGATTC	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>recA</i> (780 pb)	<i>recA</i> -F <i>recA</i> -R	ACCTTTGTAGCTGTACCACG TCGTCGAAATCTACGGACCGGA	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>gyrB</i> (911 pb)	<i>gyrB</i> -F <i>gyrB</i> -R	TCGGCGACACGGATGACGGC ATCAGGCCTTCACGCGCATC	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>mdh</i> (932 pb)	<i>mdh</i> -F <i>mdh</i> -R	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGGCTGCTGGCGG TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
MLST <i>K. pneumoniae</i>^b			
<i>rpoB</i> (510 pb)	<i>rpoB</i> -F <i>rpoB</i> -R	GGCGAAATGGCWGAGAACCA RGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>mdh</i> (477 pb)	<i>mdh</i> -F <i>mdh</i> -R	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>pgi</i> (432 pb)	<i>pgi</i> - F <i>pgi</i> -R	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>phoE</i> (420 pb)	<i>phoE</i> -F <i>phoE</i> -R	ACCTACCGCAACCCGACTTCTTCGG TGATCAGAAGTGGTAGGTGAT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>infB</i> (318 pb)	<i>infB</i> -F <i>infB</i> -R	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
<i>gapA</i> (450 pb)	<i>gapA</i> -F <i>gapA</i> -R	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C

<i>tonB</i> (414 pb)	<i>tonB</i> -F <i>ton B</i> -R	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	1 ciclo de 2 min a 95°C; 30 ciclos de 1min a 95°C, 1 min a 45°C, y 2 min a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
----------------------	-----------------------------------	---	--

^a(293)
^b(294)

3.9.3. Grupos filogenéticos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Las especies de *E. coli* y *K. pneumoniae* pueden clasificarse en ecotipos o grupos filogenéticos determinados mediante PCR. El ensayo de Clermont *et al.* permite identificar cuatro grupos filogenéticos predominantes de *E. coli* y correspondientes subgrupos, [A (A₀, A₁), B1, B2 (B₂₂, B₂₃) y D (D₁, D₂)]. Estos se basan en la amplificación de dos genes con función conocida (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN de función desconocida (224).

El ensayo de Brisse *et al.* Discrimina tres grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*, designados como KpI, KpII y KpIII, basándose en la amplificación del gen *gyrA* seguida de una digestión del producto de PCR durante 18h, a 65°C con la enzima *TaqI* y a 37°C *HaeIII* (295); Figura 8).

Los cebadores y condiciones de amplificación empleados están descritos en la Tabla 16.

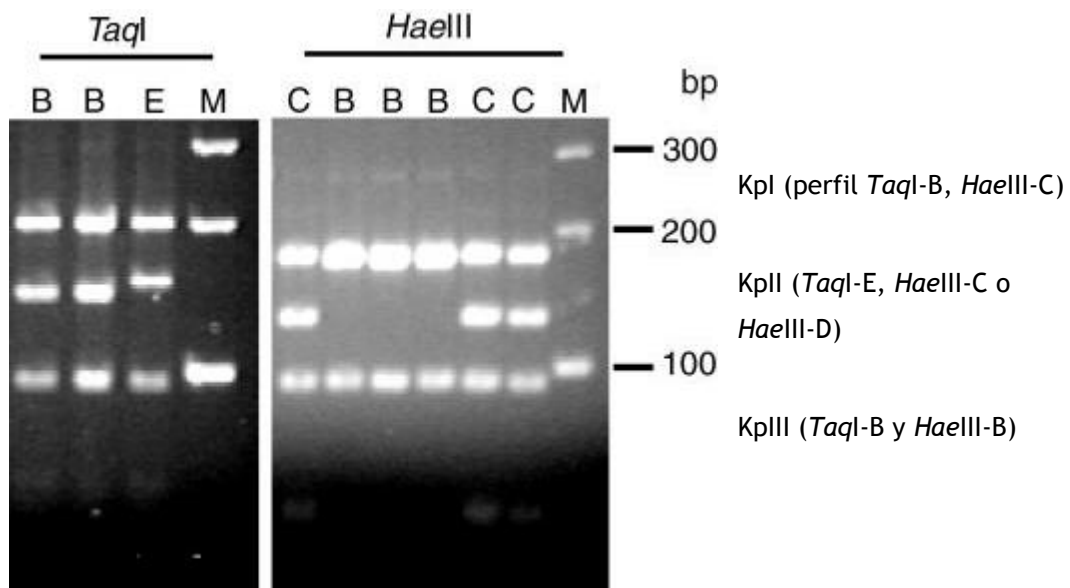


Figura 8. Amplificación y digestión enzimática de genes housekeeping utilizados en la determinación de los grupos filogenéticos de *K. pneumoniae*.

Tabla 16. Cebadores y condiciones utilizados para la caracterización de los grupos filogenéticos de los aislados de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE.

PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones
Grupos filogenéticos <i>E. coli</i>^a			
<i>chuA</i> (279 pb)	<i>chuA.1</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, y 30 s a 72°C; extensión final de 7 min a 72°C
	<i>chuA.2</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i> (211 pb)	<i>yjaA.1</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	
	<i>yjaA.2</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4C2 (152 pb)	TspE4C2.1	GAGTAATGTGGGGCATTCA	
	TspE4C2.2	CGCGCCAACAAGTATTACG	
Grupos filogenéticos <i>K. pneumoniae</i>^b			
<i>gyrA</i> (441 pb)	<i>gyrAA</i>	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	1 ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 30 s a 50°C, y 30 s a 72°C; extensión final de 5 min a 72°C
	<i>gyrAC</i>	ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	

^a (224)

^b (295)

3.10. ESTUDIOS DE TRANSFERIBILIDAD DE GENES DE RESISTENCIA

Los métodos utilizados para transferir ADN *in vitro* fueron la conjugación en medio sólido y líquido y la transformación (ver apartado 3.7.6.).

La cepa receptora utilizada en los ensayos de conjugación fue la cepa *E. coli* BM21R, resistente al ácido nalidíxico y a rifampicina, con actividad fermentadora de lactosa y curada de plásmidos, derivada de la estirpe *E. coli* K12.

3.10.1. Conjugación en medio sólido o líquido

Se partió de cultivos en caldo LB de las cepas donadoras y receptora incubados 18h y que se ajustaron a aproximadamente 6×10^8 células/mL. Se prepararon mezclas donadores/receptor (ratio 1/2) a partir de diluciones 1:100 en caldo LB. En el caso de la *conjugación en medio sólido*, la mezcla se centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 15 min y se resuspendió en 100 µl de caldo LB. Luego se inoculó en un filtro (Millipore, Billerica, MA, EEUU) colocado sobre una placa de agar LB que actuó como soporte sólido y nutricional. La placa fue incubada durante 18h a 37°C. Posteriormente, los filtros fueron resuspendidos en 1 mL de suero fisiológico. En el caso de la *conjugación en líquido* la mezcla donador/receptor se incubó durante 18h a 37°C sin agitación. Posteriormente en

ambos casos se hicieron diluciones 1:10 seriadas (10^{-1} - 10^{-6}) y se plaqueó 25 μ l, tanto de las diluciones, como del cultivo sin diluir, en placas de medio LB suplementado con los antibióticos, sulfametoxazol (100 mg/L), estreptomycin (10 mg/L) o tetraciclina (12,5 mg/L), para la selección del elemento de resistencia a aislar, y rifampicina (100 μ g/mL) para la selección de la cepa receptora. Las placas se incubaron a 37°C durante 18h. Como confirmación, los cultivos positivos se reestriaron en las placas de selección correspondientes. Los transconjugantes obtenidos se guardaron en glicerol al 20% a -40°C.

3.11. CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE TRANSMISIÓN HORIZONTAL (ETH)

3.11.1. Caracterización plasmídica

La caracterización de plásmidos incluyó su extracción (ver apartado 3.7.1.), la determinación del número y tamaño de cada uno, la caracterización de la zona de replicación y conjugación (grupo de incompatibilidad, análisis de ARNi, replicasas, relaxasas), así como el análisis de los patrones de restricción obtenidos por digestión enzimática.

3.11.2. Determinación del número y tamaño

La estimación del número y peso molecular de plásmidos se realizó comparando la movilidad de sus formas, CCC (Covalente Circular Cerrada) o lineales, con la de plásmidos de tamaño conocido (*E. coli* V517: ocho plásmidos comprendidos entre 2,1 y 54,2kb y *E. coli* NCTC 50192: plásmidos de 7, 38, 66 y 154kb) por las técnicas de Birnboim Doly (electroforesis continua) y Barton o digestión con S1 nucleasa (electroforesis de corriente alterna). El tamaño plasmídico se confirmó calculando la suma del tamaño de sus bandas tras digestión enzimática inferido por comparación con diferentes marcadores de peso molecular.

3.11.2.1. Análisis del perfil plasmídico

Las relaciones entre distintos plásmidos se determinaron por comparación de los patrones de ADN generados tras digestión con enzimas de restricción como *EcoRI*, *PstI*, *HpaI*, *HindIII* (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japón) en las condiciones indicadas por el fabricante. La separación de los fragmentos y su visualización se describen en el punto

3.7.3. No existen criterios que determinen cuál es el número de bandas que tienen que compartir dos plásmidos para que se consideren idénticos.

3.11.2.2. Determinación de los grupos de incompatibilidad

La *identificación de ARNi*, también conocido como *inc*, que codifica para una molécula de ARN de aproximadamente 70 pb que regula la replicación reprimiendo la expresión del gen de la replicasa, se realizó mediante el análisis de las secuencias obtenidas por el método de tipado de replicones por PCR (242) para los plásmidos portadores de los genes de resistencia estudiados. Este esquema permite la identificación de 21 replicones básicos representativos de los plásmidos de enterobacterias (FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA) correspondientes a los principales grupos de incompatibilidad descritos por Martine Couturier en las décadas de los 70 y 80s (296) empleando 5 PCRs múltiples y 3 simples (Tabla 17). Para la amplificación, se utilizó como molde ADN plasmídico obtenido por el método de Birnboim y Doly (ver apartado 3.7.1.). La correspondencia entre el replicón descrito y el plásmido que lleva determinado gen de resistencia se realizó mediante hibridación con sondas de replicasas específicas (ver apartado 3.7.5.) del ADN digerido con S1 nucleasa, I-CeuI o con PstI (New England Biolabs, Inc, Ipswich, MA, EEUU) transferido por el método Southern blot. La coincidencia de señal entre la hibridación de la sonda del gen *bla_{BLEE}* o *sul* y de la sonda rep en el mismo fragmento de ADN mostró la asociación entre ambos.

Además los plásmidos del complejo IncI (IncI1, IncK y/o IncB/O) fueron analizados en detalle mediante la caracterización de las replicasas y las relaxasas correspondientes. La *identificación de las replicasas* se llevó a cabo amplificando toda la región de replicación (genes *cop*, *repY* y *repA*) con los cebadores RNAI y REPZA (Tabla 18) que fueron diseñados utilizando las secuencias consenso de los plásmidos IncI: pO113 (GenBank NC_007365), R64 (GenBank NC_005014), Collb-P9 (GenBank NC_002122); IncK: R387 (GenBank M93063) e IncB: pMU707 (GenBank M93062). La *caracterización de las relaxasas (nikB)* se realizó mediante la amplificación de dichos genes utilizando los oligonucleótidos MOB12-F y MOB12-R además de la amplificación de *genes de transferencia (nikB, trbA-pndA, sogS y pilV)*, o del *sistema de restricción-modificación (ardA)* según el esquema de MLST descrito por García-Fernandez *et al.* (http://pubmlst.org/perl/bigfdb/bigfdb.pl?db_pubmlst_plasmid_seqdef) (297).

Tabla 17. Caracterización de plásmidos de *Enterobacteriaceae* basada en la identificación del grupo de incompatibilidad utilizando un esquema de múltiples reacciones de PCR (PBRT).

	Controles de las PCR multiplex inc/rep													PCR simplex inc/rep				
	1		2		3			4			5			F	K	B/O		
	HI1	HI2	I1	X	L/M	N	FIA	FIB	W	Y	P	FIC	A/C	T	FILs	F	K	B/O
HI1 (471pb)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HI2 (644pb)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I1 (139pb)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
X (376pb)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L/M (785pb)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N (559pb)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIA (462pb)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FIB (702pb)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W (242pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y (765pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P (534pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FIC (262pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
A/C (465pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
T (750pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
repFIIA (270pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F (270pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
K (160pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B/O (159pb)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabla 18. Cebadores utilizados para la caracterización de plásmidos tipo IncI1.

Cebador	Secuencia (5'-3')	N.º acc. GenBank	Posición Nt	Referencia
copAF	ATGCGCCATAAGGCATTCA	NC_005014	215-234	(228)
repAR	AGTCGCTTCAGATGGTCAT	NC_005014	1427-1408	(228)
mobP12F	GCAAAAGATGACACTGAYCCYGTITT			(228,243)
mobP12R	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTATCHGTRT C			(228,243)
ardAF	ATGTCTGTTGTTGCACCTGC	AP005147	61469-61811	^a
ardAR	TCACCGACGGAACACATGACC	AP005147	61469-61811	^a
trbAF	GCGGTTATCGGGCTACTA	AP005147	73504-73523	(67)
pndAF	GAATTCGTTGTCTGTAGCA	AP005147	75127-75108	(67)
sogSF	TTCCGGGGCGTAGACAATACT	AP005147	93125-93378	^a
sogSR	AACAGTGATATGCCGTCCG	AP005147	93125-93378	^a
pilVF	CCATATGACCATCCAGTGCG	AP005147	114804-115057	^a
pilVR	AACCACTATCTCGCCAGCAG	AP005147	114804-115057	^a

^a http://pubmlst.org/perl/bigssdb/bigssdb.pl?db_pubmlst_plasmid_seqdef

3.11.3. Caracterización de integrones

La identificación de integrones de clase 1 inusuales se realizó determinando la presencia de las secuencias de los genes *intI1*, *sul3*, *qacI*, *tnpM₂₁* y *mer₂₁* por PCR/hibridación y posteriores PCR solapantes basadas en las secuencias conocidas (Figura 9) utilizando ADN genómico y cebadores (Tabla 19)/sondas específicas.

La caracterización de la diversidad de plataformas con el gen *sul3* se estableció mediante comparación de los patrones de RFLP obtenidos tras la digestión de los amplicones generados con *HindIII*, *EcoRI* o *PstI*, y posterior secuenciación de los tipos representativos. Cada tipo de integrón fue designado arbitrariamente con un número romano (I-IV). Se utilizó como cepa control positivo del integrón clase 1 inusual conteniendo *sul3*, la cepa de *S. Typhimurium* BF272 (nº acceso GenBank EF051039) cedida por la Dra Luísa Peixe (Universidad de Porto, Portugal).

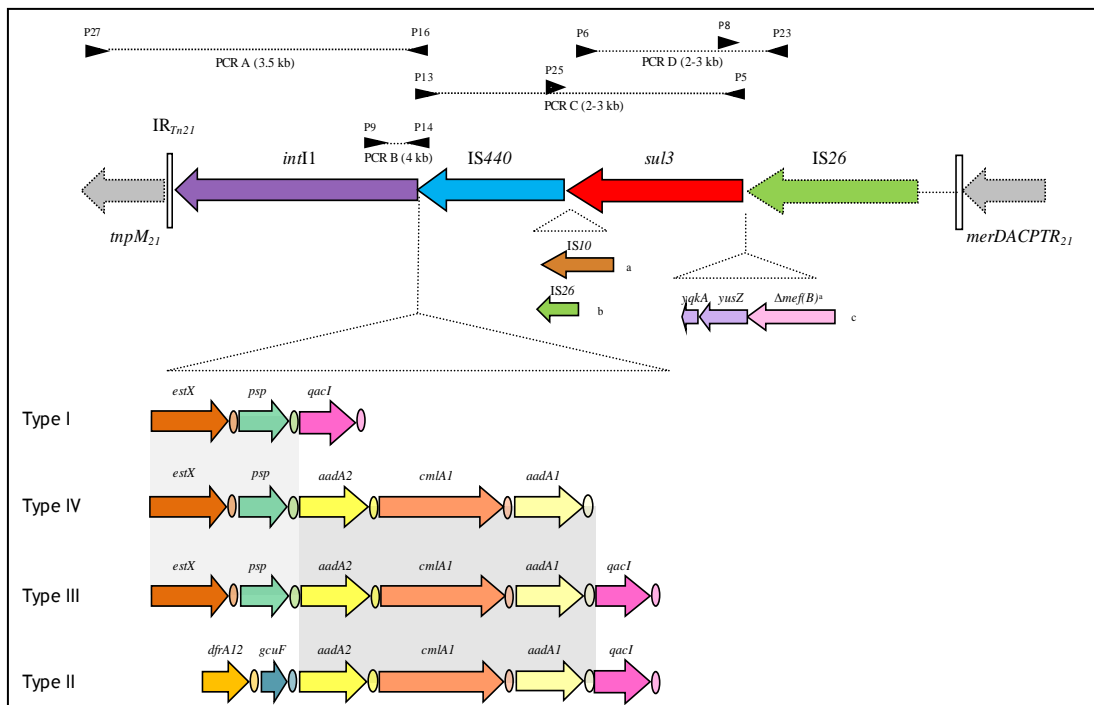


Figura 9. Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de integrones de clase 1 derivados de Tn21.

Las amplificaciones representadas se basaron en las secuencias de Tn21 y Tn402. Los oligonucleótidos empleados se incluyen en la Tabla 19 y su localización está representada por flechas negras. P13 y P14 hibridan en el gen *qacI*.

3.11.4. Análisis de las secuencias flanqueantes del gen *sul2*

Se emplearon cebadores específicos para amplificar secuencias conocidas normalmente asociadas al gen *sul2*, como *strAB*, *ISCR2*, Δ *ISCR2*, *repCpRSF1010* o *repC* y *mobC* de plásmidos de bajo porcentaje en GC de origen medioambiental (298). Posteriormente se realizaron PCRs solapantes basadas en las secuencias conocidas (Figura 10). En algunos casos se usó el RFLP para discriminar entre amplicones de tamaño similar. Al menos un amplicón de cada tipo fue secuenciado usando los cebadores adecuados (Tabla 19).

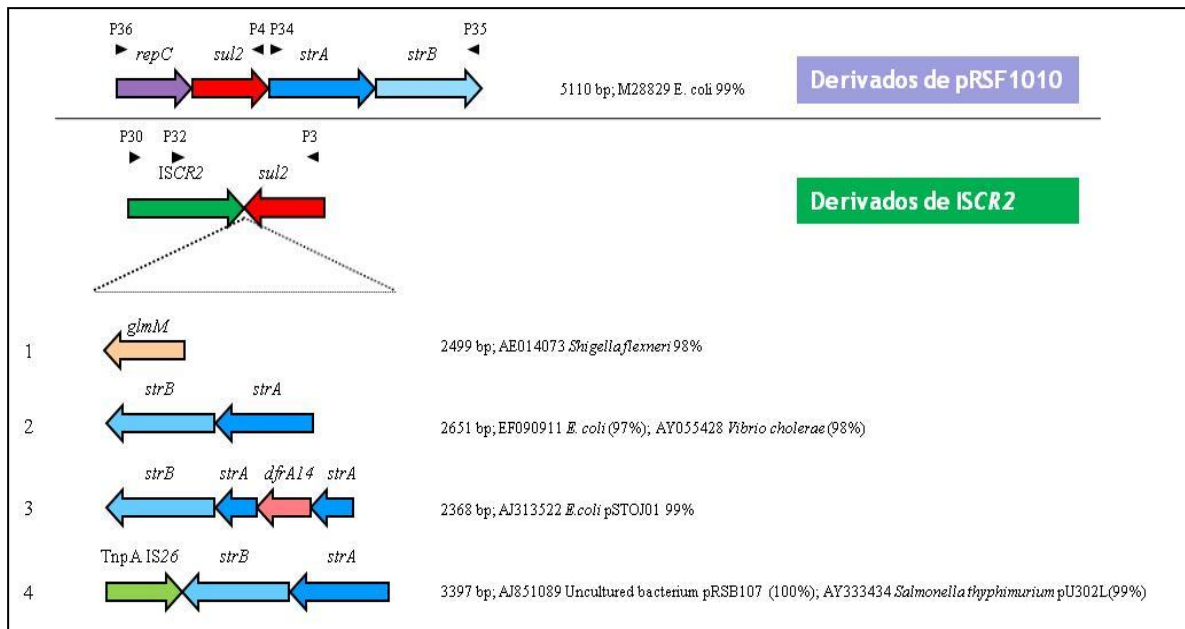


Figura 10. Esquema de PCR solapantes utilizado para la caracterización de los elementos genéticos asociados a *sul2*.

Los oligonucleótidos empleados se incluyen en la Tabla 19 y su localización está representada por flechas negras.

Tabla 19. Cebadores utilizados para la caracterización de elementos portadores de genes *sul*.

N.º	Cebador	Secuencia (5'-3')	Nº acceso GenBank	Posición Nt	Referencia
1	<i>sul1F</i>	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	EU622038	3508-3528	(299)
2	<i>sul1R</i>	GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG	EU622038	3921-3940	(299)
3	<i>sul2F</i>	GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	M36657	534-555	(299)
4	<i>sul2R</i>	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT	M36657	819-798	(299)
5	<i>sul3F</i>	GAG CAA GAT TTT TGG AAT CGT	AJ459418	2980-3001	(61)
6	<i>sul3R</i>	CTA ACC TAG GGC TTT GGA TA	AJ459418	3770-3750	(67)
7	<i>sul3F2</i>	TAT CCA AAG CCC TAG GTT AG	AJ459418	3750-3770	(67)
8	<i>sul3R2</i>	GAACTACGACTGGTTTC	AJ459418	2797-2780	(67)
9	<i>Int11F</i>	GGG TCA AGG ATC TGG ATT TCG	AF071413	4775-4755	(278)
10	<i>Int11R</i>	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G	AF071413	4333-4312	(278)
11	5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	AF174129	1236-1252	(278)
12	3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GAT	AF174129	2813-2830	(278)
13	<i>qacIF</i>	ACT GGC TCT TTC TGG CTA TT	EF051039	5064-5084	(67)
14	<i>qacIR</i>	TAA CGA TAA GTC CCA TGC CA	EF051039	5343-5323	(67)
15	<i>cmlA1F</i>	CACTTCCAAGAACGCAGACA	EF051039	2621-2641	(67)
16	<i>cmlA1R</i>	TTCCGATGCTTCCTAGCAGT	U12338	8020-8000	(67)
17	<i>cmlA1FR</i>	ACTGCTAGGAAGCATCGGAA	EF051039	3823-3803	(67)
18	<i>aadA2R</i>	TGA CTT GAT GAT CTC GCC	AF174129	2692-2709	(278)
19	<i>estX</i>	TTC CTT ATG TGC ATG GGT T	EF051039	794-813	(67)
20	<i>dfrA12F</i>	TTA CGT CCA ACG TTA GCA C	EF051037	1088-1107	(67)
21	<i>aadA1R</i>	ATTGCGCTGCCATTCTCCA	EF051037	4179-4160	(67)
22	<i>psp R</i>	ATCAGGGTGCCAGACAAGA	EF051039	1189-1170	(67)
23	IS26F	AGC GGT AAA TCG TGG AGT GA	AF205943	324-344	(278)
24	IS26R	AG GCC GGC ATT TTC AGC GTG	AF205943	979-960	(278)
25	IS440R	TGCGGGTACTTACTCCTTG	FJ587511	6415-6396	(67)
26	<i>Orf1R</i>	GCAATCCATTAGATTCATAC	FJ196385	10347-10327	(67)
27	TnpM Fw	CCGTGGTGGTGCATAGCAT	AF071413	4020-4002	(278)
28	<i>merA1</i>	ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT	AF071413	17597-17578	(278)
29	<i>merA5</i>	ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC AA	AF071413	16360-16382	(278)
30	ISCR2F	TAT GTG CAA CGG GAA TTT GA	AF231986	5123-5143	(67)
31	ISCR2R	ACT ATA GGG TCT TCA ATG CA	AF231986	6348-6328	(67)

32	<i>ΔISCR2F</i>	GAT CGC GAT ACT GGT CGT T	EF495198	11482-11502	(67)
33	<i>ΔISCR2R</i>	AAC AGG AAA CGC AGC TGA AA	EF495198	11853-11833	(67)
34	<i>strAF</i>	ATT CTG ACT GGT TGC CTG TC	AM412236	99552-99572	(67)
35	<i>strBR</i>	TAG ATC GCG TTG CTC CTC TT	AM412236	101115-101095	(67)
36	<i>repC_{pRSF1010F}</i>	AAG AAC AAG CAC AGC CTC AG	AJ851089	97495-97515	(67)
37	<i>repC_{pRSF1010R}</i>	CCG GGT GAT GTC GTA CTT G	AJ851089	98317-98298	(67)
38	<i>stb-R_C2</i>	CTG ACG AAA GAA ACC ACA TT	-	-	-
39	<i>merR_F_C1</i>	AACCGTGCTGTCTGAACTC	-	-	-
40	<i>Lyt. trR_C1</i>	AGA GTG AAC GCC AGA ACC	-	-	-

3.12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

3.12.1. Tratamiento y caracterización de secuencias nucleotídicas y proteicas de genes y otros elementos genéticos

Las secuencias de amplicones fueron analizadas y editadas utilizando el programa Chromas Version 2.32 (Technelysium Pt y Lda., Tewantin, Australia) y posteriormente comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos “National Center for Biotechnology Information- NCBI” y “European Molecular Biology Laboratory- EMBL”, utilizando las herramientas BLAST, BLASTN y BLINK. Se confirmaron los marcos abiertos de lectura (ORFs-Open Reading Frames) y se anotaron las secuencias para depositarlas en la base de datos del NCBI.

Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas y proteicas fueron realizados con las herramientas de CLUSTALW 2.0 y MUSCLE (300).

El análisis comparativo *in silico* de las secuencias asociadas a los genes *sul3* y *sul2* disponibles en la base de datos GenBank se hizo usando los software BLAST y CLUSTAL disponibles en los sitios web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> y <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. La especificidad de los cebadores diseñados fue confirmada por BLAST frente a la base de datos del NCBI para asegurar que los cebadores tenían homología elevada con la zona de interés.

La secuencia plasmídica obtenida por la tecnología “Sequencer FLX” (Sistemas Genómicos, Valencia, España) se ensambló con la ayuda de herramientas disponibles en internet como BioEdit, Staden o DNASTar. La determinación y anotación de los marcos abiertos de lectura se hizo con la ayuda de las herramientas bioinformáticas RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; <http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/RapidAnnotationServer>) y Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/act/>). Cada proteína identificada se enfrentó a la base de datos de proteínas utilizando BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además las secuencias génicas fueron comparadas y alineadas utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). El mapa plasmídico se obtuvo con la ayuda de los programas Vector NTI (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-y-Services/Applications/Cloning/vectornti-software.html>), CGView server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/) e Inkscape (<http://inkscape.org/>).

3.12.2. Análisis filogenético de la diversidad de genes *qac*

El análisis filogenético se llevó a cabo usando las secuencias nucleotídicas y proteicas de *qac* y *sul* disponibles en la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La búsqueda se hizo utilizando las herramientas de BLAST y BLINK y se incluyeron todas las variantes diferentes de secuencias de los genes *qacE*, *qacI*, *qacF*, *qacG* y *qacK*. El programa utilizado para el análisis fue MEGA5 (301) donde se obtuvieron los alineamientos por ClustalW y MUSCLE (parámetros estándar) a partir de los cuales se construyeron los arboles filogenéticos por el método de máxima verosimilitud usando un valor de “bootstrap” igual a 1000. Se utilizó como modelo de sustitución de ácidos nucleicos más adecuado, Kimura 2 (K2+G), con una distribución gamma y proporción de sitios no variables estimados a partir de los datos. En el caso de los alineamientos de proteínas se utilizó el modelo de sustitución cpREV+G. A partir de los arboles filogenéticos obtenidos se infirió la historia filogenética y se estimó la presión de selección que actuó en la trayectoria de estos genes mediante el cálculo del ratio dN/dS (sustituciones no sinónimas versus sinónimas) (302). La variancia de la diferencia fue computada usando el método de bootstrap (1000 réplicas). El análisis se hizo por el método de Nei-Gojobori para 38 secuencias nucleotídicas. Todas las posiciones con interrupciones fueron eliminadas.

Resultados y Discusión

Parte I

Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los ETH endemo-epidémicos asociados a resistencia a sulfonamidas y Qacs

4.1. ANÁLISIS FENOTÍPICO, GENOTÍPICO Y BIOINFORMÁTICO DE GENES DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS (SUL) Y SALES DE AMONIO CUATERNARIO (QAC). CARACTERIZACIÓN DE ELEMENTOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL (ETH) ENDEMO-EPIDÉMICOS ASOCIADOS A RESISTENCIA A SULFONAMIDAS

Los resultados presentados a continuación forman parte de las siguientes publicaciones (ver anexos 7.1.):

“Association of Composite IS26-sul3 Elements with Highly Transmissible IncI1 Plasmids in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing Escherichia coli Clones from Humans”, Antimicrob Agents Chemother. 2011 May; 55(5): 2451-2457.

“Diversity of genetic platforms containing sul2 genes among human clinical Enterobacteriaceae isolates” (en preparación).

4.1.1. Epidemiología de la resistencia a sulfonamidas

La *prevalencia* de resistencia a las sulfonamidas en la colección de aislados estudiada fue del 55% (n=189/344), debida mayoritariamente a la presencia de los genes codificantes de dihidropteroato sintasa (189/205 92%) denominados *sul1*, *sul2* y *sul3*. Los genes *sul1* y *sul2* fueron más frecuentemente identificados que *sul3* (48%, 37% y 6%, respectivamente). Los aislados con dos o tres genes *sul* (*sul1* + *sul2*, 22,7%) o (*sul1* + *sul2* + *sul3*, 4,4%) fueron predominantes sobre los que tenían una única variante (*sul1*, 20,6%; *sul2*, 9,9% y *sul3*, 0,9%).

La resistencia a sulfonamidas se asoció frecuentemente a la resistencia a tetraciclina (50%), estreptomycin (44%), trimetoprim (42%) y cloranfenicol (22%) (Figura 11). La frecuencia de aislados resistentes a estos antibióticos fue ligeramente más elevada entre productores de BLEE que entre no productores (57% versus 45%) (Figura 11). Los genes que confieren resistencia a sulfonamidas (*sul*) y cefalosporinas de tercera generación (beta-lactamasas, *bla*) fueron cotransferidos por conjugación en el 13% de los casos (31/240).

Los aislados resistentes a sulfonamidas fueron obtenidos de pacientes hospitalizados y no hospitalizados (69,8% versus 30,2% de las cepas 104/344).

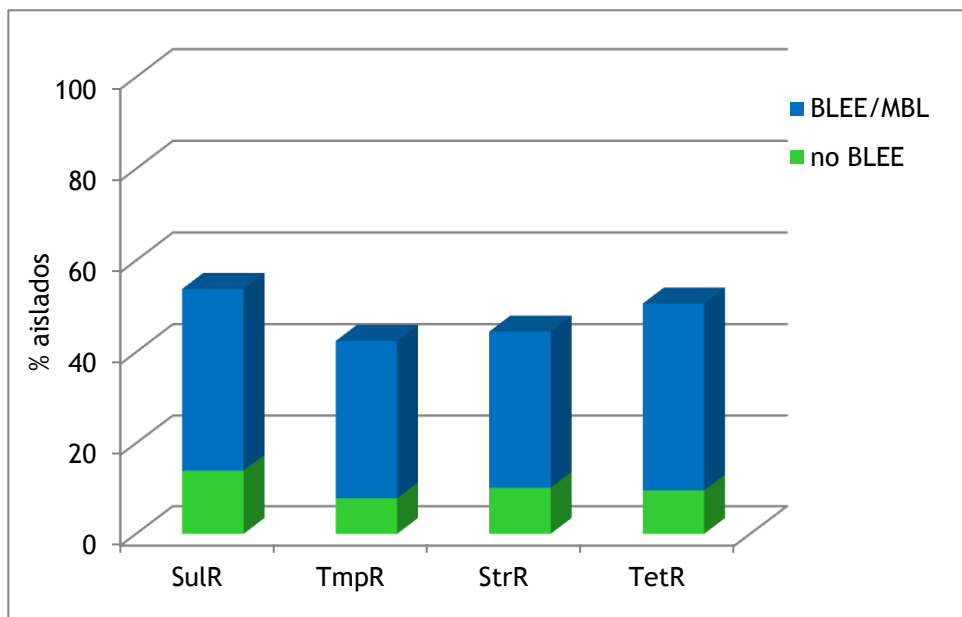


Figura 11. Análisis temporal de la resistencia a sulfonamidas, trimetoprim, estreptomycin y tetraciclina en aislados de Enterobacterias, productoras y no-productoras de BLEE del hospital Universitario Ramón y Cajal (1988-2006).

Abreviaturas: SulR, resistencia a sulfonamidas; TmpR, resistencia a trimetropim; StrR, resistencia a estreptomicina; TetR, resistencia a tetraciclina.

Los genes *sul1* y *sul2* fueron más frecuentes en aislados productores de β -lactamasas del grupo CTX-M-9/-14, en concreto de tipo CTX-M-9, mientras que *sul3* se encontró asociado principalmente a aislados productores de CTX-M-14 y SHV-12 (Figura 12). Cepas sin genes *sul* fueron predominantemente no productoras de BLEE o productoras de CTX-M-10 y CTX-M-15.

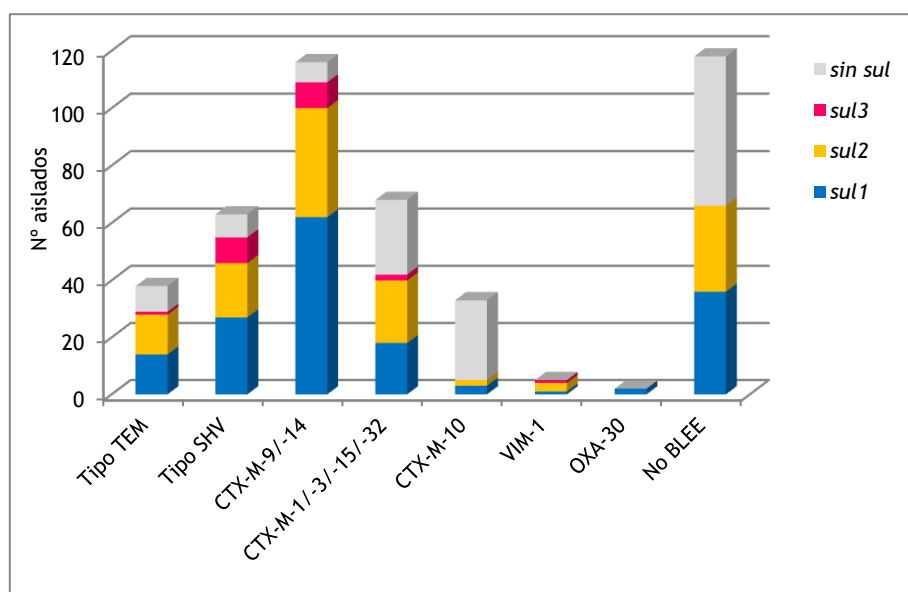


Figura 12. Distribución de los genes *sul* en aislados productores y no productores de BLEE (TEM, SHV, CTX-M), VIM-1 y OXA-30.

4.1.2. Diversidad clonal

Los genes *sul* fueron identificados en las especies *E. coli* (n=232), *K. pneumoniae* (n=48), *E. cloacae* (n=18), *E. aerogenes* (n=2), *E. gergoviae* (n=1), *Citrobacter* spp. (n=3) y *Salmonella enterica* (n=6) incluyendo algunos clones globalmente diseminados como *E. coli* ST131, *K. pneumoniae* ST14, ST13, ST533 y ST39 y el clon internacional de *E. aerogenes* productor de TEM-24 entre otros.

Los genes *sul1* y *sul2* fueron identificados con una frecuencia similar en aislados de diferentes filogrupos de *E. coli*, mientras que el gen *sul3* fue más frecuente en cepas de los filogrupos A y B1, de origen comensal y adquiridos en la comunidad (Figura 13). Las similares frecuencias relativas de aislados de *E. coli* de los filogrupos A + B1 (41,2% y

40,6%, respectivamente) y B2 + D (47,3% y 45,0%, respectivamente) entre los aislados productores de *sul1* y *sul2* sugiere que la resistencia adquirida a sulfonamidas, en los años estudiados, es igualmente prevalente en aislados de origen clínico y de adquisición comunitaria mientras que *sul3* se asoció más a los filogrupos A + B1 (68%) que a B2 + D (32%) reflejando su origen extrahospitalario.

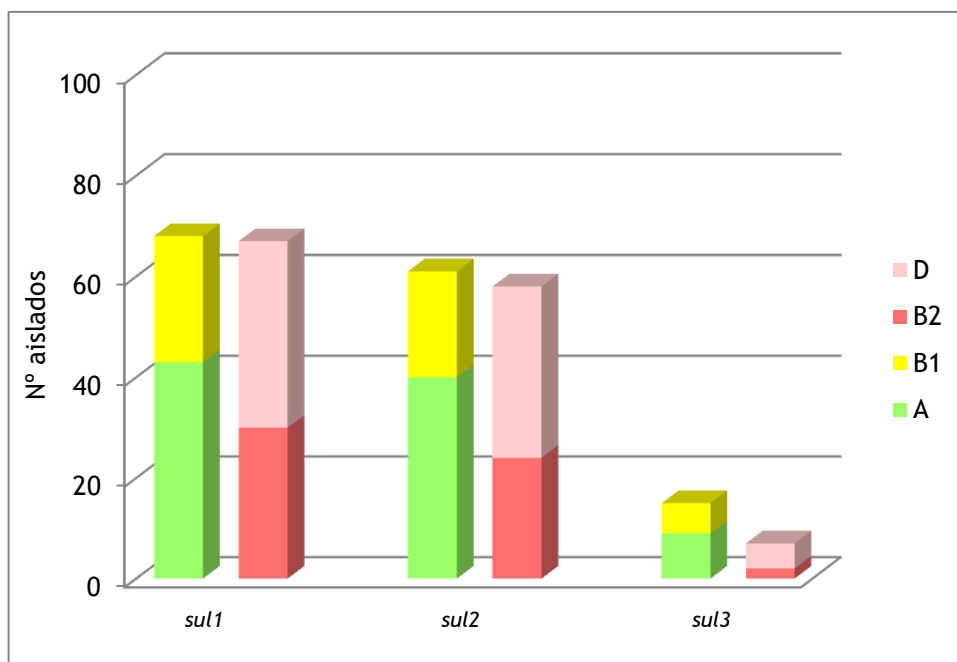


Figura 13. Distribución de los genes *sul* en diferentes grupos filogenéticos de *E. coli*.

4.1.3. Fenotipo de sensibilidad a sulfonamidas de los genes *sul*

Los aislados naturales portadores de *sul3* solo o con *sul1* o *sul2* exhibieron resistencia a sulfonamidas en un 100% (22/22) de los casos, mientras que en presencia de los tres genes, fueron resistentes a sulfonamidas un 87% de los aislados. Los aislados portadores del gen *sul2*, solo o en presencia de *sul1* expresaron resistencia a sulfonamidas en el 85% (29/34) y 86% (67/78) de los casos, respectivamente. El 82% (58/71) de los aislados en los que solo se identificó el gen *sul1* mostraron sensibilidad disminuida a sulfonamidas (Figura 14).

El estudio de la *expresión y fenotipo* de los genes *sul* en contexto isogénico de *E. coli* DH5α mostró que *sul2* y *sul3* confieren alto nivel de resistencia a sulfonamidas (CMI >1024 mg/L) mientras que *sul1* no alteró la sensibilidad de la cepa control (CMI aproximadamente igual a la CMI basal de la cepa control) (Tabla 20).

Tabla 20. Fenotipo de sensibilidad a sulfonamidas conferido por los genes *sul*.

Cepa	Gen	Contexto genético	CMI sulfonamidas (mg/L)
Receptora	-	DH5α	1,5
Control	-	DH5α (pBG18)	1
Transformante	<i>qacl</i>	DH5α (pBG18:: <i>qacl</i>)	1
Transformante	<i>sul1</i>	DH5α (pBGS18:: <i>sul1</i>)	1,25
Transformante	<i>sul2</i>	DH5α (pBGS18:: <i>sul2</i>)	>1024
Transformante	<i>sul3</i>	DH5α (pBGS18:: <i>sul3</i>)	>1024

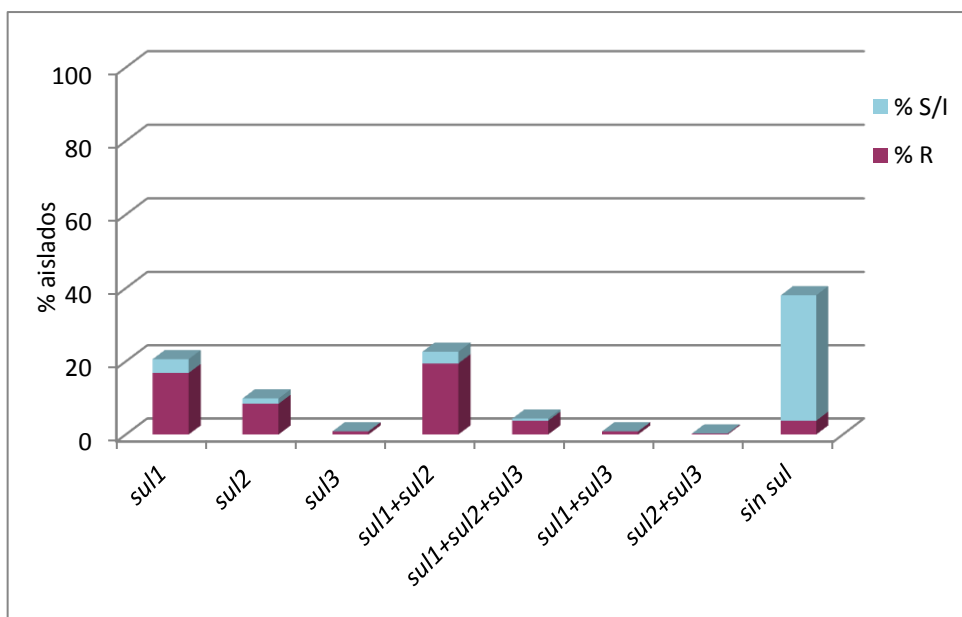


Figura 14. Frecuencia de los genes *sul* y su asociación con la sensibilidad a sulfonamidas.

4.1.4. Caracterización de las plataformas genéticas asociadas a los genes *sul2* y *sul3*

Esta tesis se centra principalmente en la caracterización de los elementos genéticos con *sul2* o *sul3* + *qacl* ya que los asociados a *sul1* + *qacl* (integrones de clase 1 y transposones mercuriales), su asociación con BLEE y sus variaciones temporales en España y Portugal fueron analizados en dos tesis dirigidas previamente por uno de los directores de esta tesis (276,278,303-305).

4.1.4.1. Contexto genético del gen *sul2*

El gen *sul2* fue localizado en plataformas asociadas a pRSF1010 (*repC-sul2-strA-strB*, n=32, 25%) y/o (Δ)ISCR2 (n=52; 40%), no habiéndose podido identificar el contexto genético en el 44% de los aislados con el abordaje experimental basado en la presencia de secuencias marcadoras de estos elementos genéticos (Figura 15). El 9% de los aislados (n=12) presentaron dos copias de *sul2* localizadas en diferentes elementos genéticos y de estos, dos presentaron una copia completa de ISCR2. La transferabilidad de dichos elementos fue mayor en elementos derivados de ISCR2 (44,4%, 16/36) que en los derivados de pRSF1010 (19,4%; 7/36). Las plataformas se identificaron mayoritariamente en *E. coli*, con casos en *C. freundii* ISCR2-*glmM-sul2* y *E. aerogenes* Δ ISCR2-*sul2*.

El gen *sul2* fue mayoritariamente asociado a plásmidos de tamaño variable (4-400kb, 61% de ellos de 50-180kb). Los plásmidos conjugativos fueron clasificados en grupos de incompatibilidad conocidos como IncFII (mayoritarios), IncFIB, IncI1, IncHI2, IncA/C, IncP, IncB/O e IncL/M, mientras que los plásmidos movilizables no fueron identificados debido a la limitación del método de tipaje utilizado aunque la secuenciación de uno de ellos permitió confirmar la presencia de IncQ, derivados de pRSF1010. Merece la pena destacar que el 9% de los aislados presentó dos copias del gen localizadas en plásmidos diferentes, generalmente conjugativo (aprox. 100kb) y no conjugativo (aprox. 10kb), independientemente del tipo de plataforma asociada a *sul2*.

El análisis *in silico* de todas las secuencias disponibles en Genbank permitió confirmar la amplia distribución de la región *repA-repC-sul2-strA-strB- Δ ISCR2* de pRSF1010 o partes de ella, en plásmidos conjugativos (IncFII, IncFIB, IncA/C, IncHI1, IncHI2, IncI1), frecuentemente integrada en los sistemas toxina-antitoxina, *pemKI*; regiones de replicación y transferencia, *traC*, *tral*, *parA* e inhibición SOS, reflejando la formación de cointegrados de pRSF1010 y otros plásmidos. En algunos casos se identificaron copias de IS26 adyacentes a esta secuencia dando lugar a plataformas con alta capacidad de transposición y recombinación. Las secuencias de *sul2* asociadas a ISCR2 (Figura 16) fueron localizadas en plásmidos conjugativos (IncHI2, IncA/C, IncFII/FIB, de baja %G+C), plásmidos movilizables y cromosomas de *Enterobacteriaceae* y otras familias de bacterias de origen medioambiental como *Vibrionaceae* (*Vibrio cholerae* y *Photobacterium damsela*), *Moraxellaceae* (*Acinetobacter baumannii*), *Pasteurellaceae* (*Pasteurella multocida*, *Pasteurella trehalosi*), *Aeromonadaceae* (*Aeromonas bestiarium* y *Aeromonas hydrophila*) *Xanthomonadaceae* (*Stenothrophomonas maltophilia*) y *Bacillaceae* (*Bacillus cereus*). Estas plataformas

albergan frecuentemente otros genes de resistencia como *tetA/tetR* y *floR* y *aphA1*, *bla*_{TEM-1}.

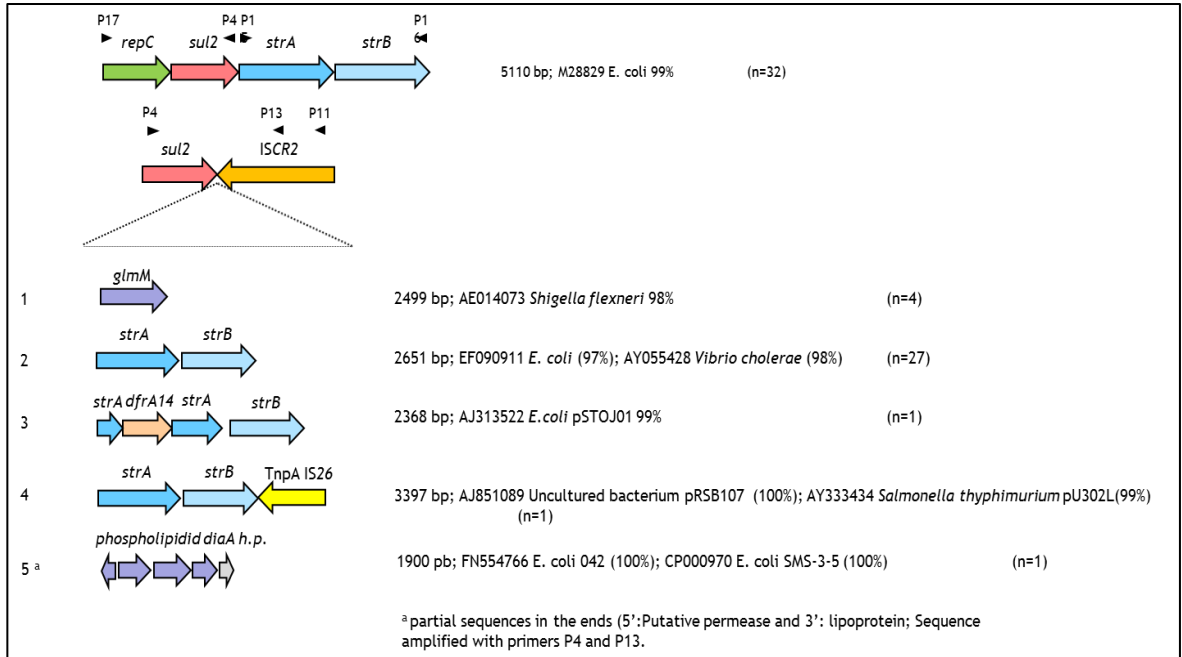


Figura 15. Análisis genotípico y bioinformático de las plataformas genéticas asociadas al gen *sul2*, identificadas en este estudio.

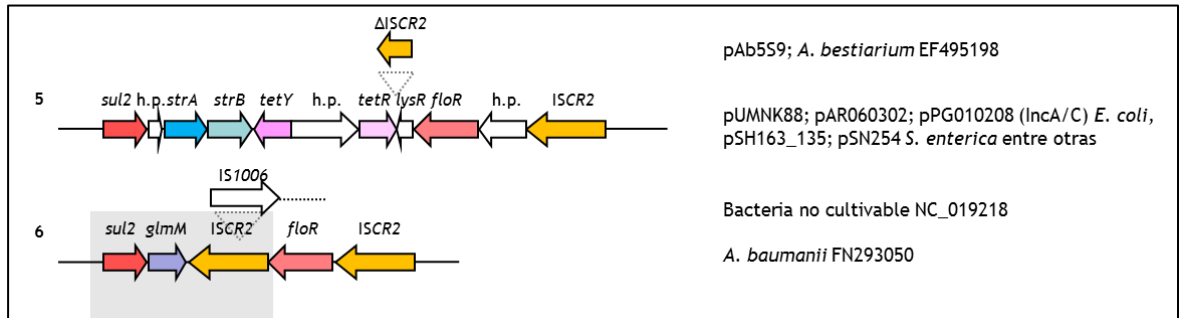


Figura 16. Otras plataformas genéticas con ISCR2(Δ) asociadas al gen *sul2* descritas en la bibliografía.

4.1.4.1.1. Análisis de los plásmidos pHRYC200 (IncQ, *sul2*) y pHRYC201 (IncFII)

Una cepa de *E. coli* B1-ST359 aislada en 1997 con fenotipo SulR-StrR-TetR y portadora de los genes *sul1*, *sul2*, *sul3* portaba tres plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFII (pHRYC201, 90kb), IncI1 (pHRYC202 de 100kb y

portador de *sul1* y *sul3*) e IncQ (pHRYC200 del tipo pRSF1010-like, 11kb y portador de *sul2*). Los plásmidos pHRYC201 y pHRYC200, transferibles por conjugación en presencia de estreptomycin o tetraciclina, fueron aislados y secuenciados.

El plásmido **pHRYC200** (IncQ, 11,047kb) fue idéntico al plásmido epidémico pSTU288-2 (11,067kb, n° acceso GenBank NC_021156, 100% identidad) de *S. enterica* Typhimurium, cepa patógena aislada de cerdos y humanos en Reino Unido y Dinamarca durante la última década (proyecto relacionado RefSeq PRJNA198746 y n° acceso GenBank CP004059). Estos plásmidos pHRYC200 y pSTU288-2 muestran una inserción del operón de resistencia a tetraciclina *tetA-tetR* en la región entre *mobC* y *strB* de pRSF1010 dejando solo 49 pb correspondientes al final de la Δ ISCR2 original (Figura 17).

El plásmido pHRYC200 presentó una delección de 24 pb en el gen regulador *tetR* respecto al del pSTU288-2, siendo 100% similar a *tetR* de los plásmidos pKF3-140 (150kb, IncFIB) y pETN48 (165kb, IncFII-FIB) y estando adyacente a *sul2-strA-strB* (306,307) (n°s acceso GenBank FJ876827 y FQ482074, respectivamente). La región que engloba el operón de resistencia a tetraciclina y la relaxasa/helicasa adyacente al módulo de *strB-strA-sul2* se ha observado en tan solo dos plásmidos secuenciados hasta la fecha, el anteriormente nombrado y otro de *Edwardsiella tarda* pEIB202, un patógeno de peces (n° acceso GenBank CP001136). El módulo con *sul2* se encuentra insertado en el pKF3-140, en la región de resistencia a macrólidos mientras que en el pETN48 en *pecM* (codificante de una proteína de membrana).

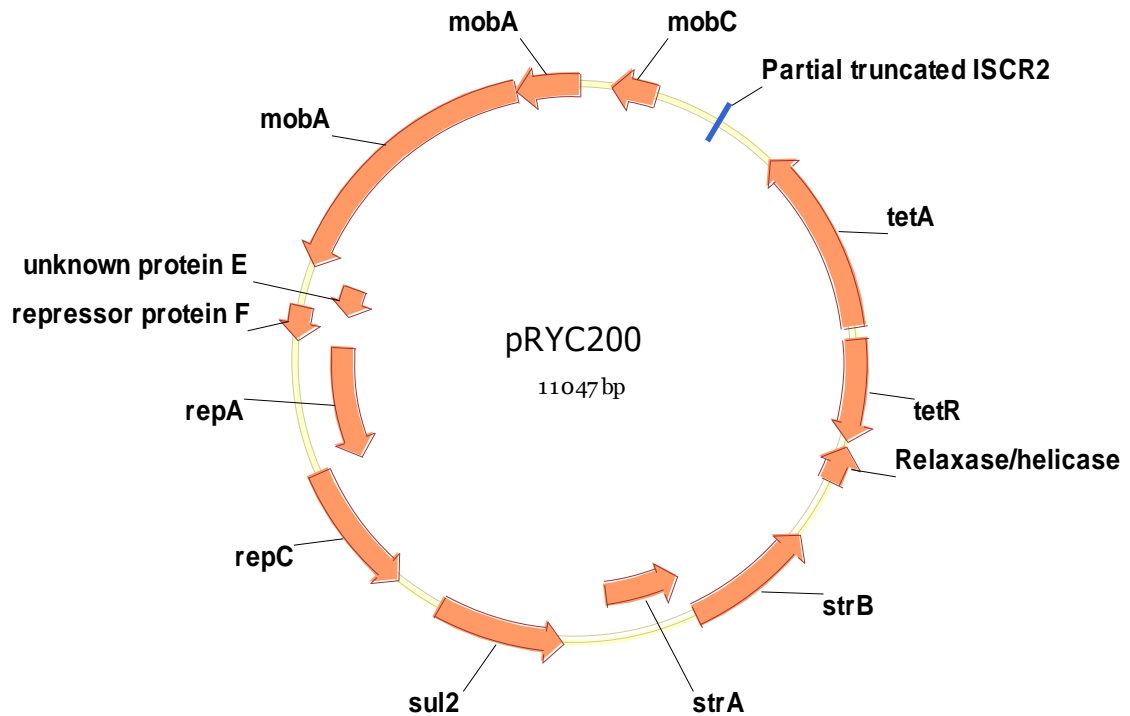
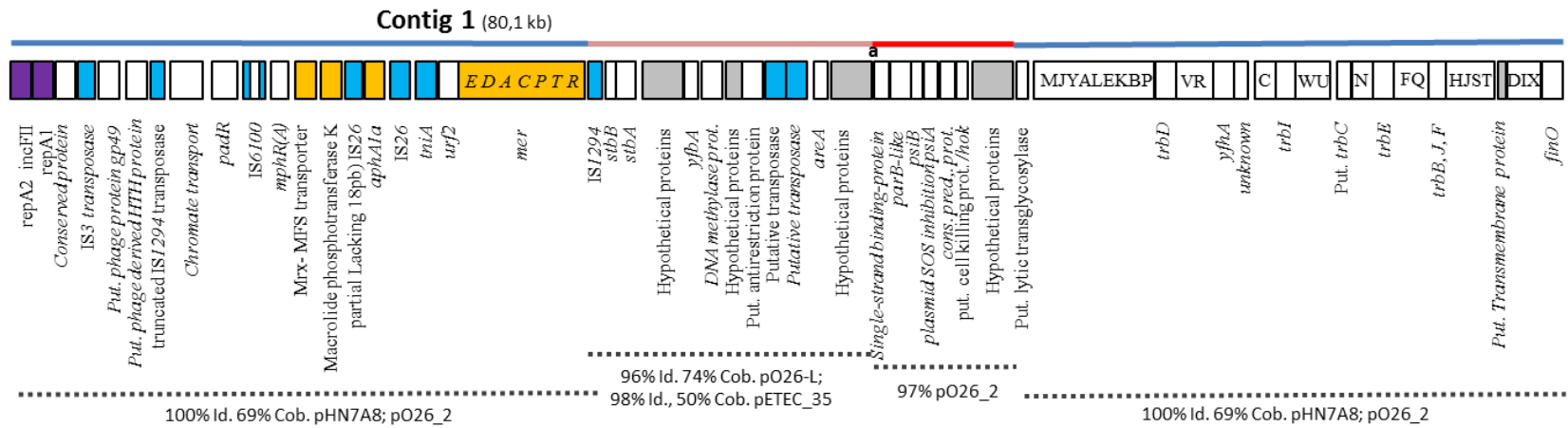


Figura 17. Representación gráfica del plásmido movilizable pHRYC200 con el gen *sul2*.

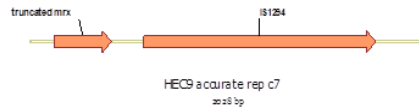
El plásmido pHRYC201 (IncFII) consta de 91.985 pb y 136 ORFs, 86 asociados a proteínas de función conocida (conjugación, estabilidad y replicación plasmídica, resistencia a antibióticos y metales) y 41 de función desconocida, con un contenido en G+C de un 47,5%. La secuencia de pHRYC201 se ensambló en 5 contigs representados en la Figura 18. Se observó una alta homología con otros plásmidos de resistencia, como pO26-2 (nº acceso GenBank AP010955), pHN7A8 (nº acceso GenBank NC_019073) o pSFO157 (nº acceso GenBank NC_009602) aislados de cepas de *E. coli* enterohemorrágicas. La secuencia del gen codificante de la proteína iniciadora de la replicación *repA2*_{IncFII} exhibió un 97% de identidad con la de otros plásmidos IncFII de *E. coli* como pO157 (nº acceso GenBank, CP001369) y pGUE-NDM (nº acceso GenBank, JQ364967). El sistema de conjugación completo *tra-trb* fue similar a los plásmidos mencionados, especialmente el pHN7A8. La región variable (contig 3 y parte del contig 1, 29.991kb) incluyó diferentes secuencias de inserción y transposasas, siendo destacable la presencia de varias copias de IS1294 perteneciente a la familia de IS91.

La región de resistencia a macrólidos *mphR(A)-mrx-mphA* apareció flanqueada por una copia de IS6100 y de IS26 adyacente a una región con genes de resistencia a cromo *chrA* y *padR*. Junto a estos genes de resistencia a metales, se identificaron dos proteínas hipotéticas posiblemente derivadas de fagos que fueron similares a otras encontradas en plásmidos de *E. coli* enterotoxigénicos como p1018 y pETEC_80 (n° acceso GenBank FN822745 y CP000795, respectivamente). En la vecindad se encontró un transposon compuesto formado por el gen *aphA1* de resistencia a aminoglicósidos flanqueado por dos copias de IS26 y el operón de resistencia a mercurio *merEDACPTR* adyacente a secuencias asociadas con Tn402 ($\Delta tniA_{Tn402}$, *urf2* e IR_{t_n2}). Esta región de aproximadamente 6kb fue 100% idéntica a la de diversos plásmidos como pR100 o pRSB107 (n° acceso GenBank AP000342 y AJ851089, respectivamente). Sin embargo no se detectaron módulos de transposición de Tn21 o Tn1696 o genes derivados de integrones de clase 1.



^a 4 pb de secuencia intergénica completada con base a la secuencia de pO26-2 (GenBank AP010955)

Contig 2 (2,3 kb) pSD77 *S. enterica*/pAR060302_2 *E. coli*



Contig 3 (11,9 kb) 17 ORFs 100% identidad; cobertura 19%; pSF0157

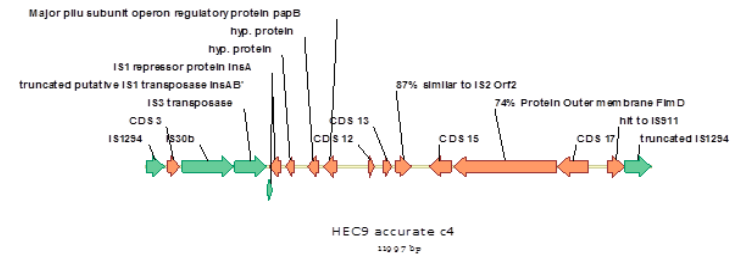


Figura 18. Diagrama representativo del plásmido pHRYC_201 por contigs.

4.1.4.2. Contexto genético del gen *sul3*

El gen *sul3* fue descrito inicialmente en integrones de clase 1 con una región 3'CS inusual compuesta también por IS440, un posible miembro de la familia IS256 (ISFinder <https://www-is.biotoul.fr/>) con 53% identidad con IS406 de *Burkholderia cepacia* (nº acceso GenBank P24575), un marco de lectura abierta sin homología conocida y un gen codificante de una bomba de eflujo de macrólidos (308) (IS440-*sul3-orf1-mefB*). Estos integrones contienen generalmente el *cassette qacl* en su parte variable (Figuras 19 y 21). El análisis comparativo de todas las secuencias de los diferentes contextos genéticos de *sul3* disponibles en la base de datos GenBank hasta la fecha ha revelado que IS440 siempre está en la vecindad del gen *sul3*, el cual se encuentra en la plataforma IS440-*sul3-orf1-mefB* (Figura 21).

En este trabajo se identificaron *cuatro arrays de integrones* diferentes designados con números romanos (Tabla 21, Figura 19). La *variante III_{S3}* fue la más común (*intl1-estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-qacl-IS440-sul3*), siendo detectada en diferentes especies de *Enterobacteriaceae* de origen humano, animal y medioambiental, mayoritariamente aislados de *E. coli* productores de BLEE/MBL desde 1997 (63,308-310). Otros arrays identificados fueron las variantes *tipo I_{S3}* (*intl1-estX-psp-qacl-IS440-sul3*), descrita por primera vez en este estudio, *tipo V_{S3}* (*intl1-estX-psp-aadA2-qacl-IS440-sul3*), detectada previamente en animales de granja en Suiza (número acceso GenBank FM242710); *tipos IV_{S3}* (*intl1-estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA1-IS440-sul3*) y *tipo II_{S3}* (*intl1-dfrA12-gcuF-aadA2-cmlA1-aadA1-qacl-IS440-sul3*), identificados en *E. coli* de los filogrupos A (productores de SHV-12 del 2000 al 2002) y B2-ST131 (productor de CTX-M-1 del año 2002) de este estudio y en aislados de humanos, animales y alimentos de países europeos y asiáticos desde 2003 (Figuras 19 y 21).

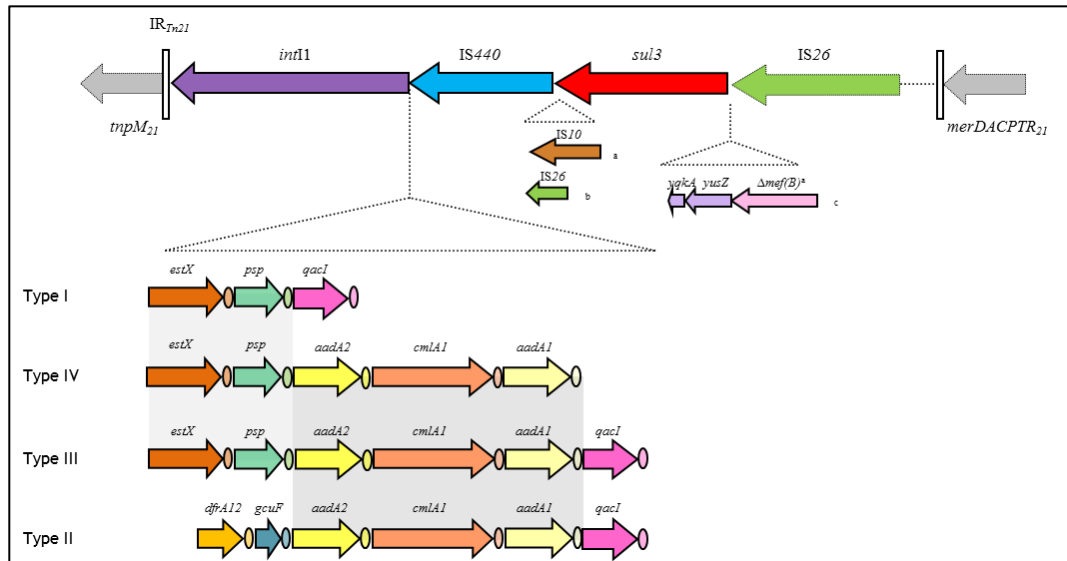


Figura 19. Integrones con *sul3* y *qacI* identificados.

Los sitios *attC* o elementos de 59-bases están representados por círculos coloreados como el correspondiente *gen cassette*.

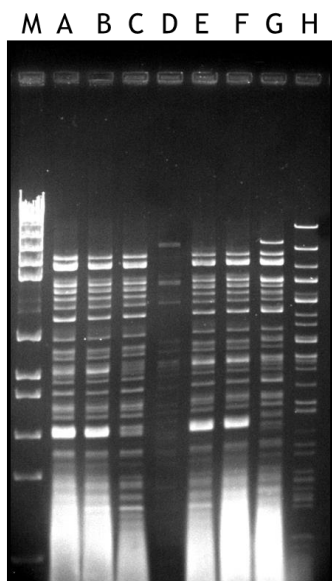
Los integrones de *sul3* descritos en esta tesis además de otros identificados en aislados de *E. coli* clínicos y de origen porcino de Reino Unido y Suiza fueron asociados a Tn21 siendo frecuentemente interrumpidos por una o varias copias de IS26 en diferentes posiciones (63,308) (n°s acceso GenBank FM242710, FM244709 y FM244713, Figura 19 y 21). La falta de sitios de duplicación a los lados de estas copias de IS26 y la presencia de idénticas plataformas de *sul3* en diversos plásmidos del mismo o diferente grupo de incompatibilidad observada aquí bien como en otros estudios, pone de manifiesto la frecuente transferencia de plataformas genéticas con *sul3* entre plásmidos mediada por procesos de recombinación homóloga al igual que sucede con *sul2*.

Los integrones identificados en este estudio fueron localizados en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad, principalmente IncIα (también llamado IncI1), transferibles por conjugación en 86% de los aislados. El integrón tipo III_{S3} fue localizado en plásmidos IncIα (100-150kb) portadores del gen *bla*_{SHV-12} y designados B, C1, C2, D, E con base a su patrón de RFLP. Los tipos B y D presentaron la region de replicación (*cop*, *repY*, *repA*) y los genes relacionados con la transferencia (*nikB*, *trbA-pndA*, *sogS*, *pilV*) o con el sistema de restricción-modificación (*ardA*) idénticos a los del plásmido pCVM29188_101 de *Salmonella enterica* serovar Kentucky, un plásmido IncI1 con un integrón de *sul3* y *bla*_{CMY-2} (n° acceso GenBank CP001121). Los tipos C1 y C2 estaban relacionados con plásmidos IncIα mosaico que, a pesar de tener secuencias *nikB*, *ardA*,

pndA y *pilV* idénticas a la de los plásmidos arriba mencionados, presentaron una replicasa similar a la del plásmido IncK R387. La secuencia de *inc-cop* del plásmido tipo C2 fue idéntica a la de pCVM19188_101 aunque carecía de un homólogo del gen *repA* y presentaba un alelo *sog5* diferente. La variante designada como tipo E mostraba los genes *repY* y *nikB* idénticos a aquellos de los plásmidos Inca pSL476_91 y pRYC106 (n°s acceso GenBank NC_011081, GQ892053, respectivamente). El tipo de integrón I_{S3} se localizó en plásmidos Inca similares a aquellos de los tipos B y D. Los asociados con el integrón tipo II_{S3} (55-125kb), identificados en plásmidos de los grupos IncY, Inc11/Iy o IncB/O, no fueron transferibles. En dos casos, se identificaron dos copias de los integrones bien de tipo II_{S3} o bien de tipo III_{S3} en plásmidos diferentes (Tabla 21).

Tabla 21. Datos epidemiológicos de los aislados de *E. coli* portadores de integrones con *sul3*.

Tipo Integrón	Plásmido <i>sul3</i> (kb) ^a	Grupo Inc	Producción BLEE	RFLP ^c	Homología (nt)		pMLST					Gr. Fil.	MLST	Año	Origen	Resistencia antibióticos ^e	Genes <i>sul</i>	Colicinas
					Replicasa	Relaxasa	<i>ardA</i>	<i>trbA pndA</i>	<i>sogS</i>	<i>pilV</i>								
I (2)	100	I1, B/O	CTX-M-14	A (2)	Iα	pETEC_73; pCVM29188	4	3	dlv 4	1	D	ST57/ST350	2000-01	Orina/P	S, Na, <u>Sul</u> , (W), (Te), <u>C</u> ; <u>K</u>	<i>sul1</i> (1)	cbi	
II (3)	125	Y	SHV-12	G	-	-	-	-	-	-	A	ST48/ST10	2000	Sangre/P	S, (Sp), (Cip), (Na), Sul, W, C, (Apr), (Te)	<i>sul2</i>	-	
	125; 55	B/O y NT ^b	SHV-12	NT	-	-	-	-	-	-	A	-	2000	Heces/VS	-	-	-	
	100	I1, B/O	CTX-M-1	F	Iα	pETEC_73; pCVM29188; pSC138	4	16	9	2	B2	ST131?	2002	Orina/P	-	-	-	
III (15)	100	I1 (6)	SHV-12; CTX-M-14 (2); CTX-M-15 (1); VIM-1 (1)	B (6)	pCMV29188_8_101; pTN38148 (1 cambio)	pETEC_73; pCVM29188	4	3	dlv 4	1	A(2) B1(3) D(1)	ND	1997-06	Orina (2)/P; Sangre/P; Heces/VS; Gangrena/P	(S), (Sp), (Na), (Sul), (W), (Te), (C), (Net), (K), (Gm), (Tb), (Ak)	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	-	
	150/100	FIB + B/O ^b ; I + B/O ^b	SHV-12	D	pCVM29188_8_101; pTN38148 (1 cambio)	pETEC_73; pCVM29188	4	3	dlv 4	1	A	ST695	2002	Orina/P	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	cbi, cma	
	100	I1, B/O	SHV-12	C1	K- pR387	pETEC_73; pCVM29188	4	3	dlv 4	1	A	ST10	2002	Orina/P	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	-	
	100	I; B/O	CTX-M-14	C2	Iα (solo cop)	pR64, pSL476_91; pCollib-P9, pNF1358; pSE11-1	4	13	2	1	B1	ST359	2002	Orina/P	-	<i>sul1</i>	-	
	50/70/90	I1, K, FIB, F Y, FIA, F K, B/O,	CTX-M-14, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, TEM-24	ND	-	-	-	-	-	-	-	A(2) B1(1) D(3)	ST167, ST351, ST648, ST624, ST131	2001-02	Orina (3)/P Cutánea/P; Genital/P; Control epidémico/	-	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	-



Línea 1, marcador de peso molecular λ -EcoT14/*Bgl*III digest (Takara Bio Inc., Shiga, Japón); línea 2, 138_sul; línea 3, HEC9_str; línea 4, F20_sul, línea 5, D32_sul; línea 6, Ec_sul; línea 7, K7_sul, línea 8, F8_sul; línea 9, E75Tc.

Figura 20. Perfiles de huella dactilar de la digestión enzimática con *Pst*I de plásmidos Inc11 (\approx 100 kb) portadores de *sul3* y *bla*_{SHV-12}.



Contexto genético	Hospedador	Origen	Regiones	Año	Nºs acc. GenBank
IS26 ^f	<i>E. coli</i>	Fecal (VS)	España	2004	EU704128
ND ^e	<i>E. coli</i>	Carne pavo	Tunisia	2008	FJ160769
pCVM19633_100 (Incl1)	<i>S. enterica</i>	-	EEUU	2008	NC_011092
ND ^e pSC138 (Incl1/F)	<i>S. enterica</i>	Humano, Porcino	Taiwan	2000-01	EU834941
		Humano		2002	AY509004
pOU7519 ^f (Incl1/FIB)	<i>S. enterica</i>	-	Taiwan	2007	EU219534
Tn21	<i>E. coli</i>	Porcino,	RU,	1999,	FJ196385,
Tn21 pRYC304	<i>S. enterica</i>	Humano,	España,	2001-02,	HQ875014,
ND		Porcino, Aves corral, Envir.	Portugal	2000-04	EF051039
ND ^e pVP2820	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM242710
ND ^e pRYC300	<i>E. coli</i>	Humano	España	2000-01	HQ875011
ND ^e pVI2402	<i>E. coli</i>	Carne picada	Noruega	2009	EF113389
Tn21 pEC355	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM244708
pRYC302 ^a , IS26 ^f IS26 ^f	<i>S. enterica</i>	Humano Comida, Humano, Porcino	España Portugal	2000-02 2000-04	HQ875013, EF501037
IS26 ^f	<i>S. enterica</i>	Productos cerdos	Portugal	2002-03	EF051038
Tn21 pEC54	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM244709
Tn21 pVP2820	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM244713
UNK ^f pP328	<i>E. coli</i>	Porcino	RU	1999	FJ196386
IS26 pVP1740	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM244710
IS26 pVP1750	<i>E. coli</i>	Animales granja	Suiza	2009	FM244712
UNK pRYC305	<i>E. coli</i>	Humano	España	2002	HQ875017
IS26 ^f	<i>E. coli</i>	Fecal (VS)	España	2004	-
ND pP126	<i>E. coli</i>	Porcino	RU	1999	FJ196384
ND ^f	<i>E. coli</i>	Porcino	RU	1999	FJ196388

Figura 21. Diversidad de integrones con *sul3* basada en estudios publicados y secuencias depositadas en la base de datos GenBank.

El gen *sul3* se asocia a integrones de clase 1 que difieren de los integrones de clase 1 con *sul1* en la región 3'CS que contienen el gen cassette inicialmente anotado como *qacH* pero renombrado *qacI* para distinguirlo del gen *qacH* de *Staphylococcus aureus* (n° acceso GenBank AF205943) (126,274). ND = No determinado.

- a) primera plataforma con *sul3* descrita en *E. coli* aislada de cerdos en Suiza en 2002 (N° acceso GenBank AJ459418);
- b) *orf1* también aparece anotado como *yqkA-yusZ* o *orfA-orfB* (N°s acceso GenBank AY509004, EU219534 y FM242710, FM244708, FM244709, FM244710, FM244712, FM244713);
- c) Inserciones de IS10 o IS26 entre IS440 y *sul3* en aislados correspondientes a los n°s acceso GenBank FJ587511; HQ875013, HQ875016 (Figure 19);
- d) la secuencia *orf1-mefB* no fue detectada;
- e) la presencia de secuencia río-arriba de *intI1* o río-arriba de *tniC* no fue determinada o estuvo ausente;
- f) El gen *mefB* está ausente o truncado; el cassette *aadA2* correspondiente a FM242710 es un híbrido de *aadA1a* y *aadA2* y posee el *attC_{aadA1a}*. En GenBank está anotado como *aadA2*.

4.1.4. Contexto genético de *qacI*

Los integrones con *qacI* son comunes entre *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* resistentes a β-lactámicos. El análisis de todas las secuencias disponibles asociadas a *qacI* demostró que este gen está frecuentemente localizado en integrones cuya región variable consta de *cassettes* que codifican resistencia a aminoglicósidos, fenicoles y β-lactámicos (*bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*). Además el sitio *attC* de *qacI* es una diana de secuencias de inserción derivadas de la familia IS1111 que pueden facilitar eventos de recombinación y transposición diferentes a los mencionados (272,311).

El análisis bioinformático realizado en esta tesis no permitió establecer el número preciso de eventos de inserción de la plataforma IS440-*sul3* ocurridos dado que no se detectaron los límites identificables de IS440. El origen de dicha plataforma genética, podría deberse a una sola inserción en un integrón ancestral río-abajo del último *gen cassette* (muy probablemente *qacI*) seguido de excisiones e inserciones de diferentes *genes cassettes* o eventos independientes de inserción en diferentes sitios *attC*.

Tabla 22. Integrones de clase 1 con *qacI* disponibles en las bases de datos.

Arreglo de genes cassette	Integrón	Hospedador	Origen	Origen geográfico	N° acceso GenBank	Referencias
IS26 int1 <i>qacI</i> aadAB aacA1b blaVEB-1 aadB arr2 cmIA5 oxa10 aadA1 \square qacE sul1 orf5 IS26	In53	<i>Escherichia coli</i>	Aislado clínico	Francia (de Vietnam), 1996	AF205943	41
int1 imp15 <i>qacI</i> Δ qacE	In205 (In95)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	Mexico, 2009	GQ856542	NP
int1 aacA7 imp15 <i>qacI</i> aadA1 orfD aadA1 Δ qacE	In203	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	Mexico, 2009	GQ856540	NP
int1 aacA7 imp15 <i>qacI</i> aadA1 oxa2 aadA1 Δ qacE	In201	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	Mexico, 2009	GQ856538	NP
int1 aacA7 imp15 <i>qacI</i> aacA4 aadA1 oxa2 Δ qacE	In95	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	Mexico, 2003, EEUU (Kentucky) 2005	GQ856538	17
int1 <i>qacI</i> dfrA32 ereA aadA2 cmIA2 aadA1	NA	<i>Salmonella enterica serovar Stanley</i>	Aislado clínico	Taiwan	GU067642	27
int1 aadB <i>qacI</i> ISKpn4	NA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Medioambiental	Malasia, 1997	EF408254	18
aacA6-33' blaGES1 blaGES5 aacA4 oxa2 <i>qacI</i> aadA1	PA-A1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aislado clínico	España	GQ337064	54
<i>qacI</i> aacA4 orfE-like	NA	No cultivable	Aguas residuales	Alemania, 2003	AY139595	50
<i>qacI</i> aadB (aadA'')	NA	<i>Brevundimonas diminuta</i> ; <i>Parococcus versutus</i> ; <i>Psychrobacter pulmonis</i> ; <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Aguas residuales Medioambiental (tratamiento de aguas de una planta de producción de penicilina y río receptor)	China, 2004-05	EU434608; EU434609; EU434604; EU434603	29
IS26 int1 <i>qacI</i> aadB (aadA'') cmIA10 aadA2 Δ qacE sul1	InPSN18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Serpiente	Francia, Guinea	AJ867811	12
int1 <i>qacI</i>	NA	No cultivable	Aguas residuales	Australia	FJ820150	19
int1 <i>qacI</i> aadA8	NA	<i>Vibrio cholerae O1</i>	Agua del mar	Angola, 1991	DQ149925	8

NA- No asignado, NP- No publicado.

4.1.5. Análisis fenotípico y genotípico de genes asociados con resistencia a sales de amonio cuaternario (QAC).

La mayoría de genes *qac*, codificantes de pequeñas bombas de eflujo clásicamente asociadas a resistencia a compuestos de amonio cuaternario (QACs) se localizan en integrones de clase 1. Hasta el momento se han descrito diferentes variantes (*qacE*, *qacI*, *qacG*, *qacF* y *qacK*, con una homología de 58% entre si). En esta sección se analizarán los fenotipos y la filogenia de estos genes.

4.1.5.1. Fenotipo de los genes *qac*

La zona codificante de distintos alelos *qac* se clonó en fase de lectura con el promotor del vector de expresión pBGS18, cuya secuencia fue determinada durante el desarrollo de esta tesis (véase Anexos 7.2.). Los abordajes metodológicos anteriormente utilizados en la literatura para la caracterización fenotípica de *qacE* y *qacF* contemplaron la expresión de una región que incluía el gen de la integrasa *IntI1* (74,312).

Varios transformantes de pBGS18::*qac* (*qacE* y 2 variantes de *qacI*) mostraron un ligero aumento de sensibilidad al TRI (de 0,06 a 0,03 mg/L), no observándose cambios de sensibilidad a BKC, CHX o BrEt (Tabla 23). Esto indicaría que los genes *qac* no confieren resistencia *per se* a QACs, al menos sin la participación de la integrasa.

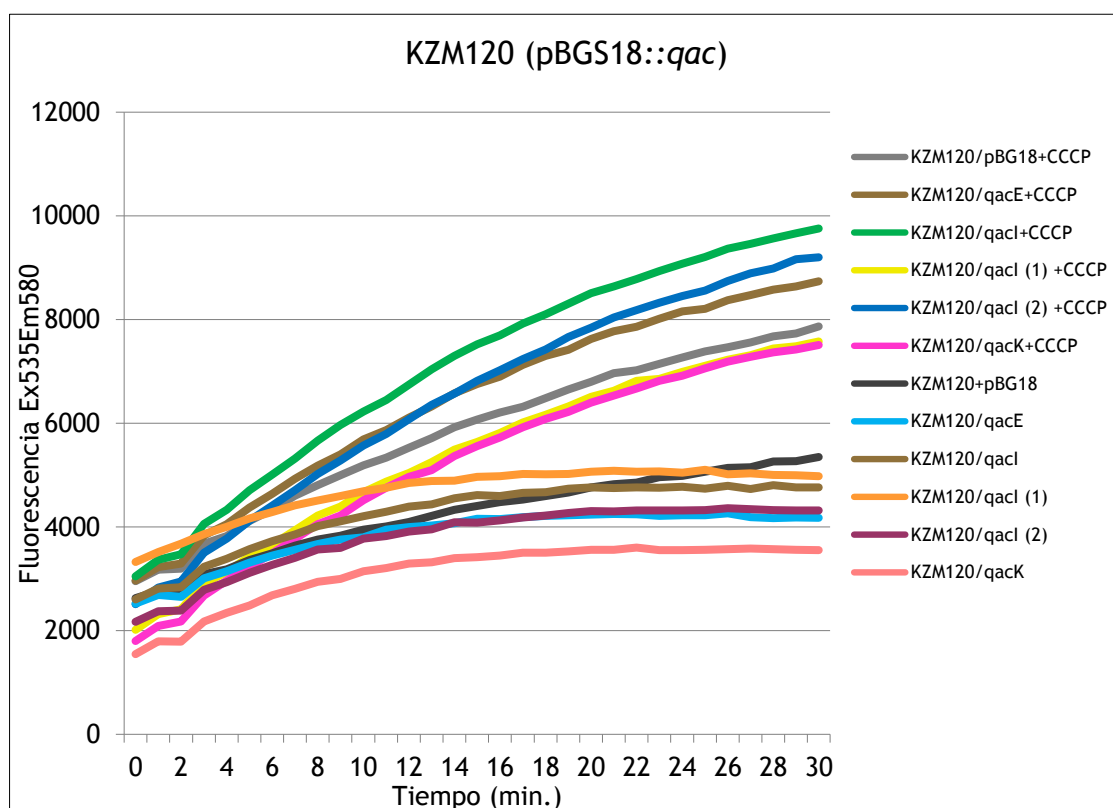
Tabla 23. Análisis del fenotipo a biocidas conferido por los genes *qac*.

Cepa	Gen	Contexto genético	TRI		BKC		CHX		NaOCl		BrEt ^b
			CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
<i>Receptora</i>	-	DH5α Na ^R	0,06	0,12	8	8	0,5	2	32768	32768	128
<i>Transformante</i>	-	DH5α (pBGS18)^a	0,06	0,25	8	8	2	4	32768	32768	128
Salvaje	<i>qacE</i>	DH5α (pR751)	0,12	0,5	1	1	<2	<2	32768	32768	-
Transformante		DH5α (pBGS18:: <i>qacE</i>)	0,03	0,5	8	8	2	2	32768	32768	128
Salvaje	<i>qacK</i>	<i>P. putida</i> (integrón)	>16	>16	64	64	4	4	32768	32768	-
Transformante	<i>qacK</i>	DH5α (pBGS18:: <i>qacK</i>)	0,06	0,25	8	8	2	4	32768	32768	128
Salvaje	<i>qacI</i>	<i>E. coli</i> (pR751)	0,12	0,25	32	64	<2	<2	65536	65536	-
Transformante	<i>qacI</i>	DH5α (pBGS18:: <i>qacI</i>)	0,03	0,25	8	8	2	2	16384	32768	128
Salvaje	<i>qacI</i>	<i>E. coli</i> _D63 (integrón)	0,03	1	16	32	4	4	65536	65536	-
Transformante	<i>qacI</i> (1)	DH5α (pBGS18:: <i>qacI</i>)	0,06	0,25	8	8	2	2	32768	32768	128
Salvaje	<i>qacI</i>	<i>E. coli</i> _138 (integrón)	0,12	1	16	16	4	4	65536	65536	-
Transformante	<i>qacI</i> (2)	DH5α (pBGS18:: <i>qacI</i>)	0,03	0,5	8	8	2	2	32768	32768	128

^a Cepa control. Los valores de CMI y CMB están expresados en mg/L.

Los genes *qac* clonados en la cepa de *E. coli* deficiente en AcrAB-TolC (KZM120) originaron cambios en la acumulación de BrEt, en función de la presencia o ausencia del inhibidor de bombas de protones (CCCP, carbonil cianida m-clorofenil hidrazona), indicando la funcionalidad de la bomba Qac. Más específicamente, se produjo una mayor acumulación de BrEt en presencia de CCCP respecto a la cepa control, en los transformantes que contenían pBGS18::*qacE*, pBGS18::*qacI*(2) que en los transformantes con pBGS18::*qacK* y pBGS18::*qacI*(1) (Figura 22).

Figura 22. Ensayo de actividad de bombas de eflujo: acumulación de bromuro de etidio en presencia o no del inhibidor de bombas de protones CCCP para transformantes de *E. coli* KZM120 portadores de pBGS18::*qacE*, pBGS18::*qacK*, o pBGS18::*qacI* en relación a la cepa control *E. coli* KZM120::pBGS18.



4.1.5.2. Filogenia de genes *qac*

Los 5 genes *qac* descritos en gramnegativos (*qacE*, *qacI* y *qacF*, *qacG*, *qacK*), han sido identificados en aislados bacterianos de origen clínico, animal y medioambiental y presentaron variantes en su secuencia nucleotídica. El análisis filogenético a nivel nucleotídico y aminoácido refleja dos clusters, uno representado por *qacE* y *qacK*, y otro donde se encuentran los alelos *qacG*, *qacI*, *qacF*, siendo *qacF* y *qacI* genéticamente

más cercanos (Figura 23). El alineamiento de estas proteínas reveló una identidad aminoacídica de 82% con una p-distancia < 0,8.

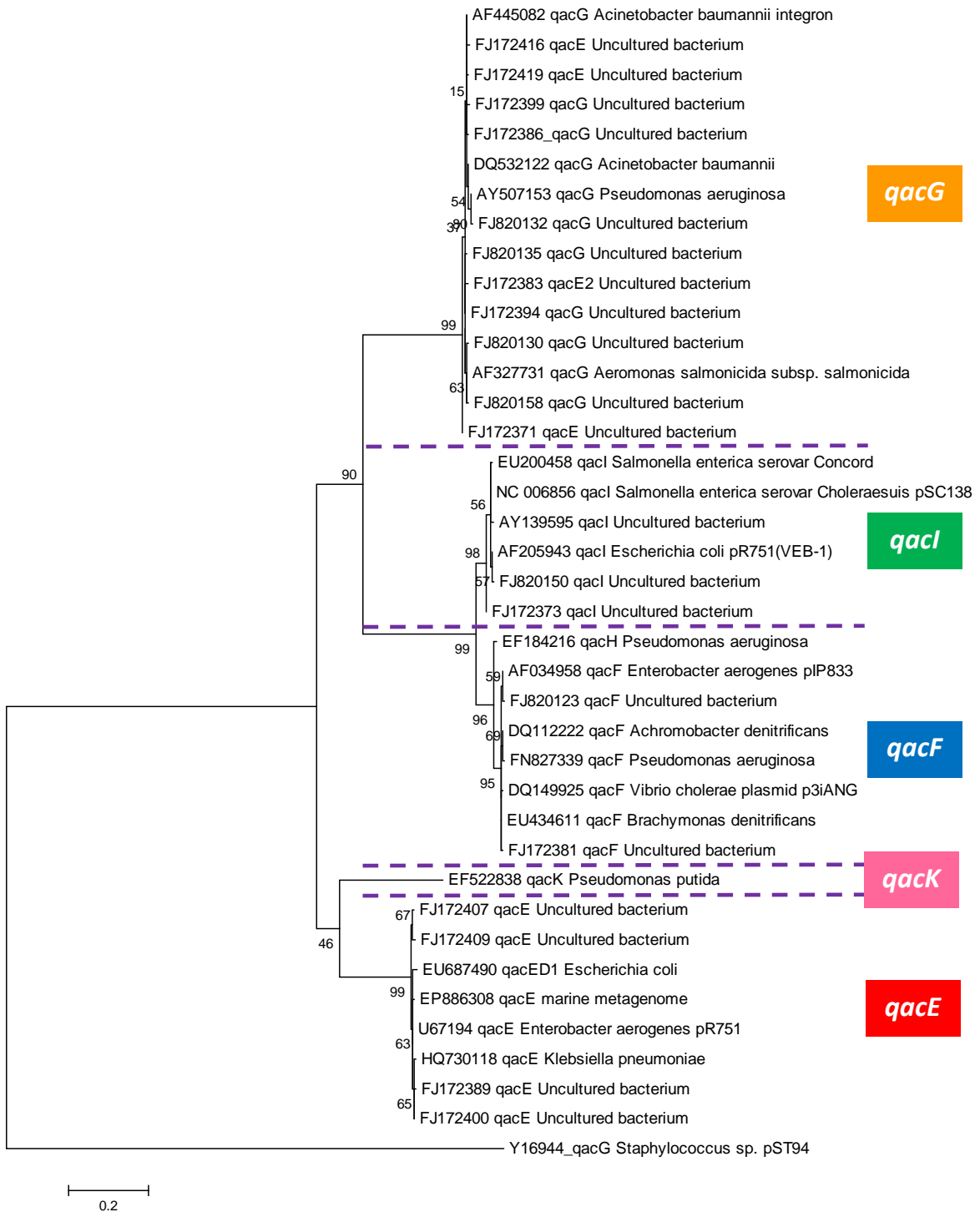


Figura 23. Análisis filogenético de genes *qac* de Proteobacteria.

Árbol filogenético obtenido por el método de máxima verosimilitud, bootstrap de 1000 réplicas a partir del alineamiento de 38 secuencias nucleotídicas codificantes de las distintas variantes de *qac* usando como grupo externo la secuencia Y16944 *qacG Staphylococcus*.

La probabilidad de rechazar la hipótesis nula de neutralidad estricta ($dN = dS$) a favor de la hipótesis alternativa de selección purificadora ($dN < dS$) fue significativa según el Z-test de selección basado en codones (301). Así, en la evolución de los genes *qac* ha actuado una *selección purificadora*, indicando poca conservación de los genes a lo largo de la evolución.

La heterogeneidad en las secuencias *attC* y el tamaño de los diferentes cassetes de genes *qac* subraya diferentes orígenes para estos genes. Mientras *qacE*, *qacG* y *qacK* presentan diferentes *attC* y tamaño variable y atípico (141, 99 y 117 pb, respectivamente), los sitios *attC* y el tamaño de los genes *qacF* y *qacI* (60 pb) es similar (Figura 24).

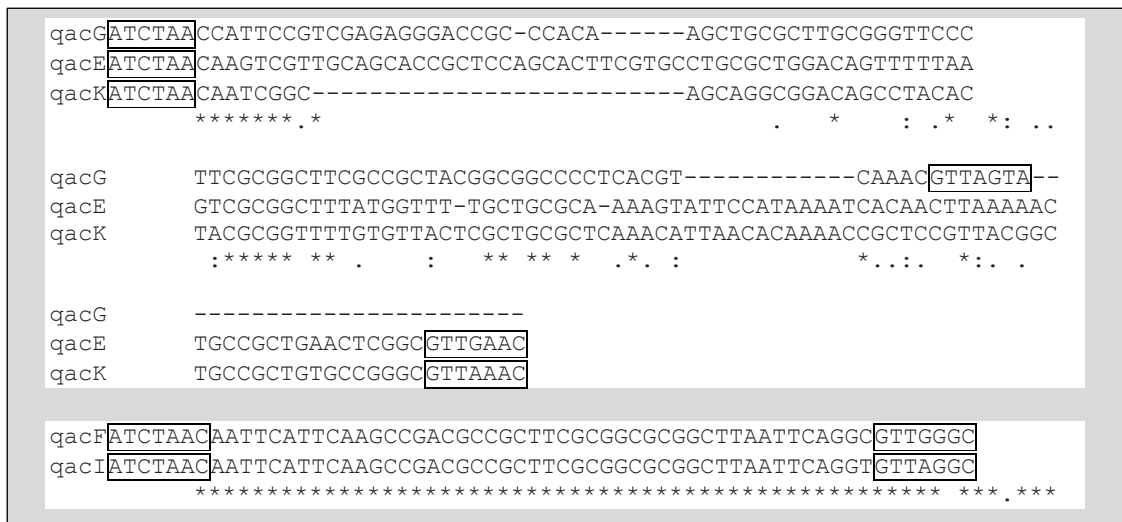


Figura 24. Alineamiento de las secuencias *attC* de los genes *qac* prototipo.

qacE n° acceso GenBank U67194, *qacI* n° acceso GenBank AF2059843, *qacF* n° acceso GenBank AF034958, *qacG* n° acceso GenBank AF327731, *qacK* n° acceso GenBank EF522838.

Tabla 24. Características epidemiológicas de los genes descritos y sus variantes.

Gen <i>qac</i>	Otro nombre	Contexto genético (integrones clase 1)	Microorganismo	Origen	Año	País	Identidad	GenBank	Proteína acc.	Referencia
<i>qacE</i>		Int dfrllc Unk(orfD) qacE tniC tniB tniA	<i>E. aerogenes</i> (pR751)	Aislado clínico	1972-73	UK		U67194	AAC64463	(313)
<i>qacE</i>	<i>qacE</i>	<i>qacE</i> igual al de FJ663011 Int11 IS1066 <i>qacE</i>	Metagenome marino; Bacteria uncultivable	Metagenoma marino (superficie de agua marina); Suelo cañaveral alterado con efluente de trituradora textil con basura de alta concentración en QACs	2003; 2009	Diferentes localizaciones: Mar sargasso, Canal Panama, E islas Galapagos; UK (Yorkshire)	99%	EP886308 ; FJ663011	EDA73252; ACV97150	(314); (68)
<i>qacE</i>	<i>qacE</i>	Tn1721 Int11 <i>qacE</i> tniRQBA	<i>K. pneumoniae</i> (Tn1721)	Comensal de pacientes en UCI	2004-05	Australia (Sidney)	98%	HQ730118		(315)
		Int11 <i>qacE</i>	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172389		(316)
		Int11 <i>qacE</i>	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172409		(316)
		Int11 <i>qacE</i>	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172407		(316)
		Int11 <i>qacE</i>	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172400 FJ172384		(316)
		Int11 dfrA17 aadA5 qacED1 sul1 orf513 CTX-M-1 orf3 IS3000 qacED1 orf5	<i>E. coli</i>	Aislado clínico	2005-06	China		EU687490		(317)
		Int11 VIM-4 aacA4 OXA-35 qacED1	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico	2001	Suécia		AY866525		(318)
		tnpR urf2 Int11 VIM-2 aacA4 qacED1 sul1	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico (neonato)	2002	Polonia		AJ515707		(319)
<i>qacF</i>		Int11 aac6-1b qacF cm1B OXA-9 orf4 sul1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Aislado clínico (orina)	1992	Francia (Paris)	100%	AF034958	AAD22143	(312)
		Qac	<i>Brachymonas</i>	Agua residual de	2004-05	China	99%	EU434611	ACA23029	(320)

		<i>denitrificans</i>	producción de antibióticos de planta tratamiento y río receptor						
	Int11 qacH aadA8 Int11 aacA7 qacF-like IMP-18 aadA1	<i>Vibrio cholerae, P. aeruginosa</i>	Aislado clínico; -	1991-96; UNP	Angola; -	98%	DQ149925 ; AB587676	AAZ42322	(321); No publicado
	Int11 aacA4 fosC OXA-2 qacF VIM-2 OXA-2 aacA4 ereA qacED1	<i>Achromobacter denitrificans/ P.aeruginosa</i>	Orina	Unp	Corea	98%	DQ112222	AAZ14837	No publicado
	Int11 VIM-2 qacF orf 2 orf3 qacEd1	<i>Serratia marcescens</i>	Aislado clínico (orina)	2000	Corea	97%	AY030343	AAK40353	(322)
	Int11 qacF	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clinic	2010	Costa Rica:San Jose		FN827339	CBM06475	No publicado
	Int11 qacF qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ820123	ACS73595	(323)
	Int11 qacF	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	99%	FJ172420		(316)
qacG	qacE2	<i>Aeromonas salmonicida, Aeromonas veronii bv sobria</i> ; Bacteria no cultivable	; animal acuático; Agua pecera	1986; 2007; 2008	EEUU; Taiwan; UK	100%	AF327731; DQ462520; FM957877		(324); (325); (326)
	Int11 orf71 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	99%	FJ172394	ACN22646	(316)
	Int11 IMP-4 qacG aacA4 catB3	<i>A. baumannii</i>	Aislado clínico	1994-98	China	98%	AF445082	AAL38576	(327)
	Int11 cupin 2 barrel qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	97%	FJ172386	ACN22635	(316)
	Int11 IMP-4 qacG aacA4 catB3	<i>A. baumannii</i>	Aislado clínico	1996/2001	China	97%	DQ532122		(328)
	IsPa7 Int11 VIM-2 OXA-2 aacA4 aadB qacG tniC Int11 qacG	<i>P. aeruginosa</i> ; Bacteria no cultivable	Aislado clínico (clone epidémico); Biofilme agua dulce	1996-2004; 2008	Francia (nantes); Australia (sidney)	97%	AY507153; FJ172380		(329); (316)
	Int11 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	96%	FJ172416		(316)
	Int11 qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia		FJ172399		(316)

		Int11 qacG orfD qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	(Sidney) Australia (Sidney)		FJ820158	(323)
		Int11 qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ820120	(323)
		Int11 qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ820132	(323)
		Int11 orf71 qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ820135	(323)
		Int11 qacG	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ820130	(323)
		Int11 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172419	(316)
qacE		orf175 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	99%	FJ172384	(316)
		Int11 orf71 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172383	(316)
		Int11 qacE	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172371	ACN22612 (316)
qacI	qacH	IS26 Int11 qacI aadB aaCA1b orfG VEB-1 aadB arr-2 cmlA5 OXA-10 aadA1 qacEd1 sul1 orf5 traC IS26 / Int11 qacH dfrA32 ereA1 aadA2 cmlA1 aadA1 / Int11 qacI OXA-10 aadA1 h.p. sul1	<i>E. coli</i> pR751; <i>S. enterica</i> , <i>A. hydrophila</i>	Aislado clínico (de niño 4 meses); pez deacuacultivo	1996, 2001-02 -	Vietnam, Taiwan, Tailandia	100%	AF205943;JX141473	(330); (323)(331)
		Int11 qacH	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	100%	FJ820150	(316)
	qacH	Int11 IS26 tetA tetR IS26 int11 qacI aadB cmlA10 aad2 qacEd1 sul1 orf5 orf6 IS6100 (Tn compuesto)	<i>P. aeruginosa</i> (cloneVI)	Heces de serpientes sanas	2004	Francia	100%	AJ867811	(332)
	qacH	Int11 aac6'-33 GES-1 GES-5 aacA4 OXA-2 qacH aadA1 qacDE	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico (hemocultivo - clone epidemico A)	Persist at least 2007-2008	España	100%	GQ337064	(333)

qacH	Int11 qacH dfrA32 ereA aadA2 cmlA aadA1	<i>S. enterica</i> sv Stanley	-	2001-2002	Taiwan	100%	GU067642	(334)
	Int11 qacH	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)	100%	FJ172378	(316)
	Int11 sat psp aadA2 cmlA1 aadA1 qacF IS440 sul3	<i>S. enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar CholeraesuiscepaSC-B67	Aislado clínico (sepsis)	2002	?	99%	NC_006856	(335)
	Int11 qacH aadA1	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Concord	Portador sano (niño) Clone epidemico n=20	2004	Etiopía	98%	EU200458	(336)
	Int11 aacA7 aadA7 IMP-15 qacH aac4 aadA1 OXA-2 aadA1 qacED1	<i>P. aeruginosa</i>	Aislado clínico	2003	Mexico	98%	EF184216	ABO47752 (337)
	Int11 qacH aacA4 orfE-like	Bacteria no cultivable	Barros contaminados	2001	Alemania		AY139595	(338)
	Int11 qacH aadA	Bacteria no cultivable	Biofilm agua dulce	2008	Australia (Sidney)		FJ172373	(316)
qacK	Int11 VIM-6 OXA-10 aacA4 aadA1 qacEd1	<i>P. putida</i>	Aislado clínico (orina)	2000	Singapur		EF522838	(339)

4.1.6. Discusión

El uso de sulfonamidas como opciones terapéuticas de primera elección ha ido disminuyendo progresivamente en el mundo occidental a medida que han ido apareciendo otros antibióticos más eficaces y con menos efectos secundarios (58). Sin embargo en países en desarrollo, se siguen utilizando sulfonamidas en humanos y en veterinaria. La presión selectiva creada por su uso generalizado en amplias áreas geográficas y por la presencia de concentraciones subinhibitorias de sulfonamidas en aguas naturales, de consumo y residuales, así como la localización de genes de resistencia en elementos móviles portadores de resistencia a otros antibióticos, biocidas y metales, parecen haber contribuido a la selección, persistencia y diseminación de genes *sul* y *qac* a nivel global y en diferentes nichos ecológicos (80,84,86,316,340,341). La presencia de diferentes genes de resistencia a sulfonamidas en especies bacterianas de origen humano, animal y ambientes contaminados por actividades humanas ha sido extensamente documentada (64,84,342), siendo *sul1* considerado como un marcador genético asociado con la actividad del hombre (343) y *sul2* y *sul3* asociados más a contacto con animales (8,69,71,131,344).

La prevalencia de resistencia a sulfonamidas y de genes *sul* en esta tesis fue semejante a la descrita en otros estudios (65,86,345-347), con un alto porcentaje de aislados resistentes a sulfonamidas (Sul^R), estreptomicina (Str^R), tetraciclina (Tet^R) y trimetoprim (Tmp^R). El patrón de multiresistencia $Sul^R Str^R Tet^R Tmp^R$ en bacterias productoras de BLEE y en no productoras indicó la amplia distribución de elementos portadores de genes de resistencia a los primeros antibióticos introducidos en el arsenal terapéutico y la adquisición de nuevos genes de resistencia en las mismas unidades genéticas (plásmidos, integrones, transposones).

La caracterización del entorno genético de los genes *sul2* y *sul3* reflejó la amplificación de clones y ETH frecuentemente asociados a hospedadores y hábitats específicos. El gen *sul3* parece haber tenido una penetración reciente y haber sido seleccionado entre las poblaciones de *E. coli* de aves y cerdos de granja (308,345,347-349) mientras que *sul1* y *sul2* están ampliamente diseminados entre diferentes géneros bacterianos de diversos orígenes desde hace décadas. El gen *sul3* se identificó sobre todo en clones de los filogrupos A y B1 de individuos sanos y animales (350,351). Dentro de estos filogrupos menos virulentos y tradicionalmente asociados a infecciones comunitarias y zoonosis, se han descrito clones altamente transmisibles con capacidad de colonizar animales y humanos (226). La identificación de secuencias de plásmidos,

similares a aquellos de aislados animales de diferentes especies indicó la existencia de plásmidos con capacidad de intercambiar caracteres adaptativos entre diferentes clones de la misma o diferente especie. Dada la elevada capacidad de transferencia de ciertos plásmidos no es de descartar la posibilidad de diseminación *in vivo*, como ha sido descrito previamente (83).

Los plásmidos IncI1, son responsables de la diseminación de genes *sul* y de resistencia a beta lactámicos de amplio espectro (352) como los que codifican enzimas BLEE de tipo CTX-M-1,-3,-14,-15, CMY-2, SHV-12 o TEM-52, (228,297,350,351,353-355). Los plásmidos IncF son muy prevalentes en enterobacterias de origen animal, humano y medioambiental (352) y amplificadores de genes de resistencia a sulfonamidas (*sul2*), aminoglicósidos, β -lactámicos (*bla*_{CTX-M-15}) y carbapenémicos (*bla*_{NDM-1}), quinolonas (65,84,227,234,238,356). La cotransferibilidad de un plásmido IncFII y el plásmido movilizable con *sul2* sugiere una asociación entre ambos y podría explicar la frecuencia de plataformas con *sul2* entre estos plásmidos conjugativos, por eventos de recombinación.

La abundancia de transposasas y proteínas derivadas de fagos, en los plásmidos estudiados en esta tesis como los de los grupos IncFII e IncI1, parece facilitar la adquisición y la recombinación de material genético y por tanto la capacidad de adaptación y diversificación de los genomas. Las plataformas de genes *sul* forman parte de conjuntos genéticos que presentan a menudo copias completas de ISs, frecuentemente IS26 o IS10 flanqueadas por repeticiones directas de la secuencia diana original. De este modo, podrían contribuir a la rápida diseminación en la naturaleza de los determinantes de resistencia asociados, como *sul2* y *sul3* además de *bla*_{CTX-M} y *bla*_{SHV} (67,257,267,357), aminoglicósidos o macrólidos (Figura 18). Además de las ISs mencionadas, las plataformas genéticas modulares en las que se localizan los genes *sul* ofrecen nuevas oportunidades de recombinación.

Los integrones inusuales con *sul3* son mosaicos derivados de la recombinación entre secuencias (*estX-*psp*-*aadA2** o *dfrA12-gcuF-aadA2*) habituales en integrones de clase 1 con *sul1*, secuencias idénticas a la del Tn1696 (*aadA2-cmlA1*, n° acceso GenBank AF313472) y la plataforma IS440-*sul3*-*orf1-mefB*. Las diferencias en los elementos 59-bases de los genes *cassettes psp* y *aadA2* (este correspondiendo a una variante única del gen *cassette aadA* que contiene el elemento 59-bases del gen *cassette aadA1b*, n° acceso GenBank FM242710) subraya la posibilidad de arreglos río-abajo del gen *cassette psp*. Los integrones con *sul1* están ampliamente diseminados entre *Enterobacteriaceae* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. de humanos y animales. El sitio

attC del gen *qacI* constituye una diana para secuencias de inserción de la familia IS1111 lo que podría amplificar las posibilidades de eventos de transferencia lateral en integrones diseminados (272,311). Dada la variedad de integrones con genes implicados en la resistencia a diferentes familias de antibióticos (β -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas) y *qacI*, sería posible que existiese un origen común de estas estructuras genéticas de multirresistencia. Los genes correspondientes habrían sido adquiridos en plásmidos de aislados bajo presión selectiva con antibióticos y/o biocidas, comúnmente utilizados en medicina y veterinaria. Solamente en escasas cepas aisladas de cerdos en el Reino Unido a finales de los años 90 se observaron integrones de clase 1 inusuales con *sul3* pero sin el gen *qacI* en su parte 3' conservada: *aadA1-IS440-sul3-orf1-mefB* o *aadA3-IS440-sul3-orf1-mefB* (nºs acceso GenBank FJ196384 y FJ196388 respectivamente), lo cual sugiere la casi exclusiva asociación entre el gen *cassette qacI* y la plataforma IS440-*sul3-orf1-mefB* (Figura 21, apartado 4.1.4.2.). La región intergénica entre IS440 y *sul3* presentó diferentes inserciones y también el gen *sul2* se asoció frecuentemente a ISCR2 (entera o truncada), en diversidad de plásmidos (81,358).

La presencia de un gen no siempre es sinónimo de su expresión ya que esta depende, tanto, de promotores locales como de reguladores globales, pudiendo su expresión estar silente (359). La asociación de los genes *qac* y *sul* con un fenotipo de resistencia a sulfonamidas y biocidas no ha sido demostrada en todos los casos, habiendo sido inferida por homología de secuencia para algunos genes (60,74,312,360-362). Los resultados obtenidos en esta tesis reflejan que el gen *sul1*, no confiere disminución de sensibilidad a sulfonamidas ni los genes *qacE*, *qacI* y *qacK* confieren resistencia a QACs en experimentos normalizados de expresión utilizando vectores y background comunes. Aunque los resultados sugieren otra función diferente a la de resistencia a los compuestos mencionados para estos genes son necesarios otros estudios utilizando la proteína traducida a partir del gen *sul1* o las resultantes de la expresión de *qacs*. Dada la gran divergencia entre las proteínas Sul2 (271 aa) y Sul3 (263 aa) respecto a Sul1 (279 aa) (135/279 y 114/279 aminoácidos, respectivamente), la diferencia de fenotipos podría ser explicada por diferencias en el dominio pterato de ligación al sustrato. En aislados clínicos multirresistentes no podemos descartar la presencia de mecanismos de resistencia a antibióticos y biocidas, como por ejemplo las bombas AcrAB-TolC o MdtM que puede tener más influencia en la resistencia a QACs, que las bombas codificadas por *qac* (104,108). Tampoco podemos excluir la posible implicación de diversos elementos en la disminución de sensibilidad a determinados antimicrobianos. De hecho, aunque la

resistencia clínicamente relevante a sulfonamidas en enterobacterias haya sido asociada principalmente a genes *sul* localizados en plásmidos, otros mecanismos como mutaciones en el gen cromosómico *folP* codificante de la enzima DHPS, o la actividad aumentada de sistemas de expulsión podrían ocasionar un fenotipo de sensibilidad disminuida (58,363)

Por último, el análisis bioinformático de los genes *qac* nos permitió analizar su diversificación y los posibles efectos del uso de agentes antimicrobianos sobre su evolución. El uso de agentes antimicrobianos suele favorecer la selección positiva sobre diferentes genes y facilitar su persistencia y diseminación. La diversificación observada en el caso de los genes *qac*, podría reflejar la penetración de dichos genes en distintas especies y/o nichos ecológicos. Además los diversos alelos podrían tener un origen diferente, dada la gran variabilidad en su sitio específico de recombinación (*attC*). La influencia de una selección purificadora y la ausencia de un fenotipo de disminución de sensibilidad a QACs (BKC) o BrEt podrían revelar que algunos genes *qac* no han sido seleccionados en respuesta a la presión por biocidas. Es de resaltar que, aunque el papel de los genes *qacs* y *sul1* en la coselección de resistencia fuera menor o inexistente, otros factores como su localización en ETH portadores de otros genes adaptativos podrían garantizar su amplificación génica.

En resumen, los genes adquiridos de resistencia a las sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*) y sales de amonio cuaternario (*qac*) se encuentran en un número limitado de integrones y/o transposones localizados en una gran variedad de plásmidos conjugativos, contenidos en aislamientos de *Enterobacteriaceae* de origen clínico y comunitario. Estas plataformas parecen haber contribuido de forma significativa a la adquisición de genes adaptativos y a la selección y persistencia de clones de esta familia de microorganismos.

La caracterización genética y análisis poblacional de los elementos genéticos portadores de genes *sul2* (plataformas derivadas de plásmidos IncQ y asociadas a ISCR2) y *sul3* (integrones inusuales de clase 1 asociados a bombas de eflujo SMR) ponen de manifiesto diferentes eventos de captura, selección y diseminación.

Parte II

Biocidas usados en la práctica clínica.

**Actividad e impacto sobre la selección y
diseminación de la resistencia a antibióticos**

4.2. ACTIVIDAD DE BIOCIDAS DE USO FRECUENTE

La amplia utilización de biocidas a nivel global durante las últimas décadas plantea serios problemas de Salud Pública que incluyen i) la contaminación medioambiental, ii) la toxicidad en humanos y animales (<http://www.psr.org/environment-and-health/confronting-toxics/pesticides/triclosan.html>; <http://www.ewg.org/news/testimony-official-correspondence/fda-needs-protect-people-and-environment-triclosan>), iii) el riesgo de comprometer su eficacia por el desarrollo de resistencias y iv) la contribución de dicha resistencia a la selección y diseminación de la resistencia a antibióticos (SCENIHR 2009, 2011) (364,365). Diversas agencias como la Food and Drug Administration (FDA), o la US Environmental Protection Agency (EPA), intentan evaluar el impacto del uso de biocidas en diferentes ámbitos (<http://www.psr.org/environment-and-health/confronting-toxics/pesticides/triclosan.html>) pero existen pocos datos sobre su efecto en la microbiota y la sensibilidad de patógenos oportunistas a estos compuestos lo cual limita la implantación de medidas eficaces para minimizar el efecto de los biocidas.

En general, la información disponible sobre la sensibilidad a agentes biocidas hace referencia a la potencia de estas sustancias para eliminar diferentes microorganismos (bacterias, virus y hongos) y no a la sensibilidad de las poblaciones de diferentes especies de patógenos oportunistas a determinados compuestos (13,18,164,165,168,366-369).

El objetivo de este apartado fue determinar la actividad de cuatro biocidas, ampliamente utilizados en el medio hospitalario (TRI, BKC, CHX, NaOCl), sobre patógenos oportunistas frecuentemente aislados en humanos y animales (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. y *Listeria* spp.), estableciendo los ECOFFs que cada especie tiene para dichos compuestos (ver apartado 4.2.1.) y determinar la relación entre la sensibilidad a biocidas y la resistencia a antibióticos (ver apartado 4.2.3.).

Los resultados de este estudio están incluidos en un trabajo colaborativo realizado dentro del proyecto europeo BIOHYPO, donde además se analiza la sensibilidad de otras especies (ver anexos 7.1.): *“Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms”* (PlosOne; en prensa, ver anexos).

4.2.1. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), bactericidas (CMB) y puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs)

Los resultados de la actividad de los biocidas TRI, CHX, BKC e hipoclorito sódico se encuentran representados en la Figura 25 y la Tabla 25. Las distribuciones de CMIs y CMBs de cada biocida fueron generalmente unimodales en forma de campana de Gauss, excepto para CHX (CMI y CMB) en el caso de *Enterobacter* spp., y para TRI en los casos de *Enterobacter* spp. (CMB), *E. coli* (CMI y CMB) y *S. aureus* (CMI y CMB). Únicamente en el caso del TRI, la curva de distribución de los valores de CMB estuvo desplazada a la derecha (3-4 diluciones respecto a los valores de CMI), lo cual indica una acción de tipo bacteriostática del compuesto (Tabla 25, Figura 25).

La actividad de los biocidas sobre las especies de microorganismos **grampositivos** estudiadas fue variable aunque, con la excepción de *S. aureus* frente al TRI, en todos los casos la distribución de los valores de CMI y CMB fue unimodal. *Listeria* spp. fue ligeramente más sensible a TRI y CHX, con curvas de distribución desplazadas a la izquierda en relación a las de *Enterococcus* spp.. La comparación de estos valores con los de *S. aureus*, cuya sensibilidad fue analizada por otro grupo de trabajo dentro del proyecto BIOHYPO, reveló que *S. aureus* es la especie de microorganismos grampositivos más sensible a biocidas, y las especies de enterococos el grupo de organismos menos sensibles al TRI, CHX e NaOCl. La sensibilidad de *E. faecalis* y de *E. faecium* al TRI fue similar pero *E. faecalis* fue ligeramente más sensible a BKC y más resistente a CHX y NaOCl que *E. faecium*.

La actividad de biocidas fue parecida para las diferentes especies de **Enterobacterias**, exceptuando *Salmonella* spp., que fue menos sensible a TRI y BKC y más sensible a NaOCl (Figura 25). En general, las enterobacterias fueron menos sensibles a BKC y más sensibles a TRI que las especies de microorganismos grampositivos analizados, siendo similares los valores de CMI y CMB para CHX (Tabla 25, Figura 25). *S. aureus*, la especie de grampositivos más sensible, exhibió una sensibilidad a TRI similar a la de las especies de gramnegativos. Los valores de CMB y CMI al TRI para grampositivos difirieron de 1 a 2 diluciones, a diferencia de lo observado en aislados gramnegativos, lo cual indicaría una actividad bactericida del compuesto frente a estos microorganismos.

Los valores de ECOFF variaron según el compuesto y la especie o grupo de microorganismos grampositivos o gramnegativos (Tabla 25), de forma similar a lo expuesto anteriormente. Los valores de ECOFF de TRI fueron los más variables (0,5 a 16

mg/L), siendo *S. aureus* la especie con menor valor y las de *Enterococcus* spp. (16 mg/L), *Listeria* spp. y *S. enterica* (8 mg/L) las de valor más elevado. Para CHX los valores de ECOFF variaron entre 8 a 64 mg/L, siendo *S. aureus* y *Listeria* spp. las especies más sensibles (8 y 16 mg/L, respectivamente). Los valores de ECOFF para BKC fueron uniformes entre los microorganismos gramnegativos (64 mg/L) y entre los grampositivos (16 mg/L). Ya en el caso de NaOCl, los valores de ECOFF para las distintas especies fueron iguales (16,4 g/L), a excepción de *S. aureus* que presentó menor punto de corte (4,1 g/L).

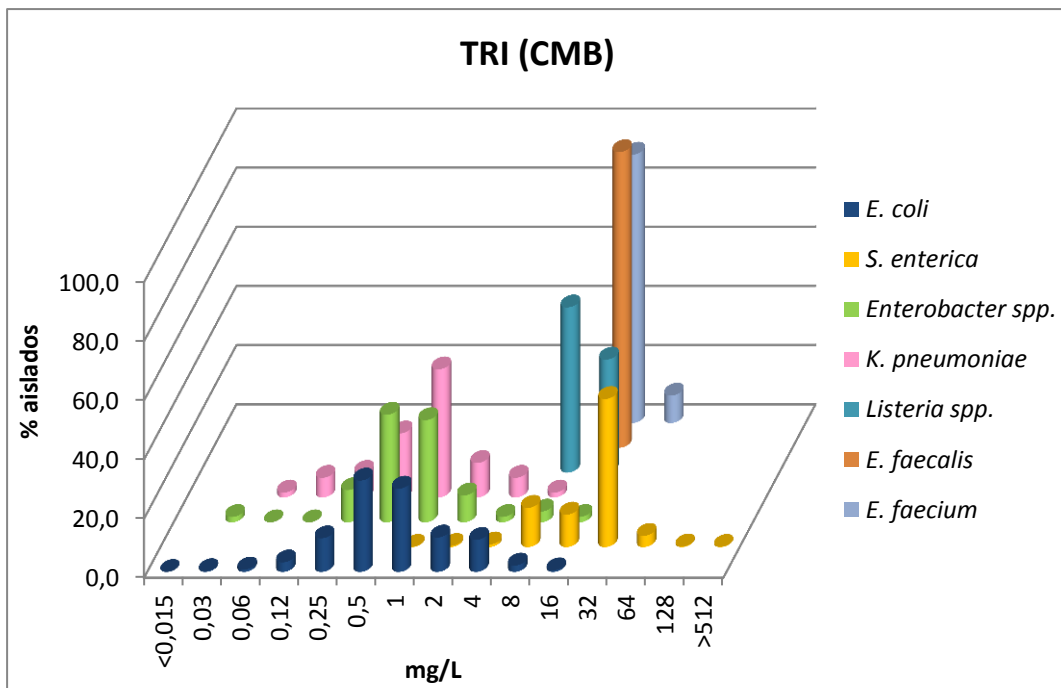
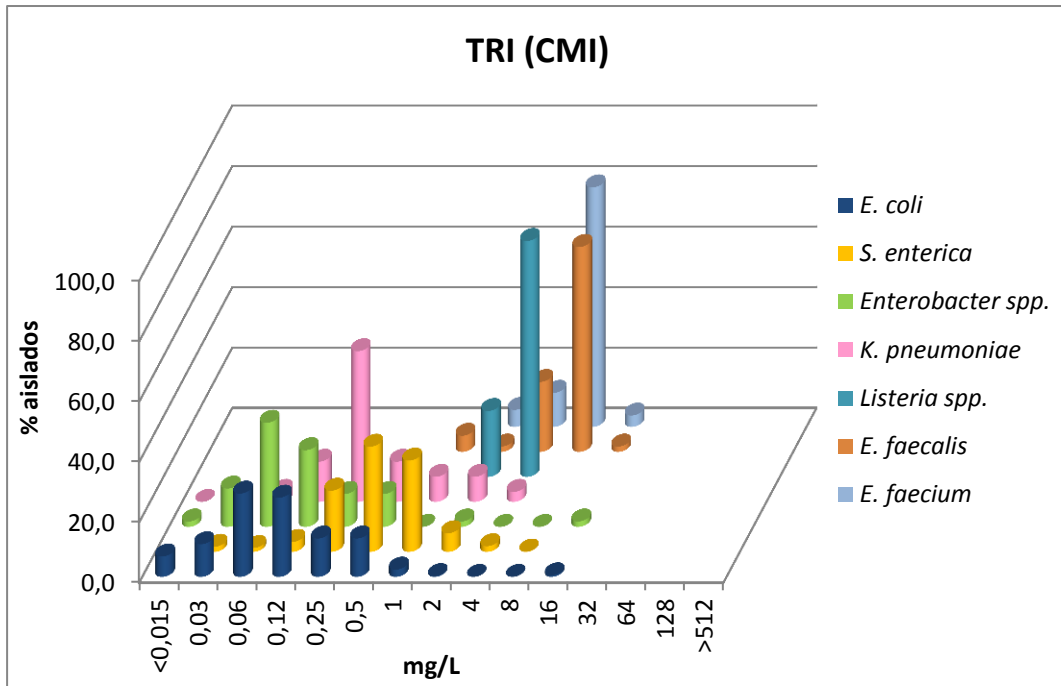
Veinticuatro aislados presentaron sensibilidad disminuida a alguno de los biocidas: BKC (n=7, CMI \geq 64 mg/L), CHX (n=4; CMI \geq 64 mg/L), TRI (n=13, CMI \geq 1 mg/L), dos de ellos exhibiendo notable disminución de sensibilidad a TRI y CHX en *E. coli* (CMI_{TRI}=16 y 64 mg/L y CMI_{CHX}= 64 mg/L). Por el contrario, no se encontraron cepas con fenotipo TRI^RBKC^R ni BKC^RCHX^R.

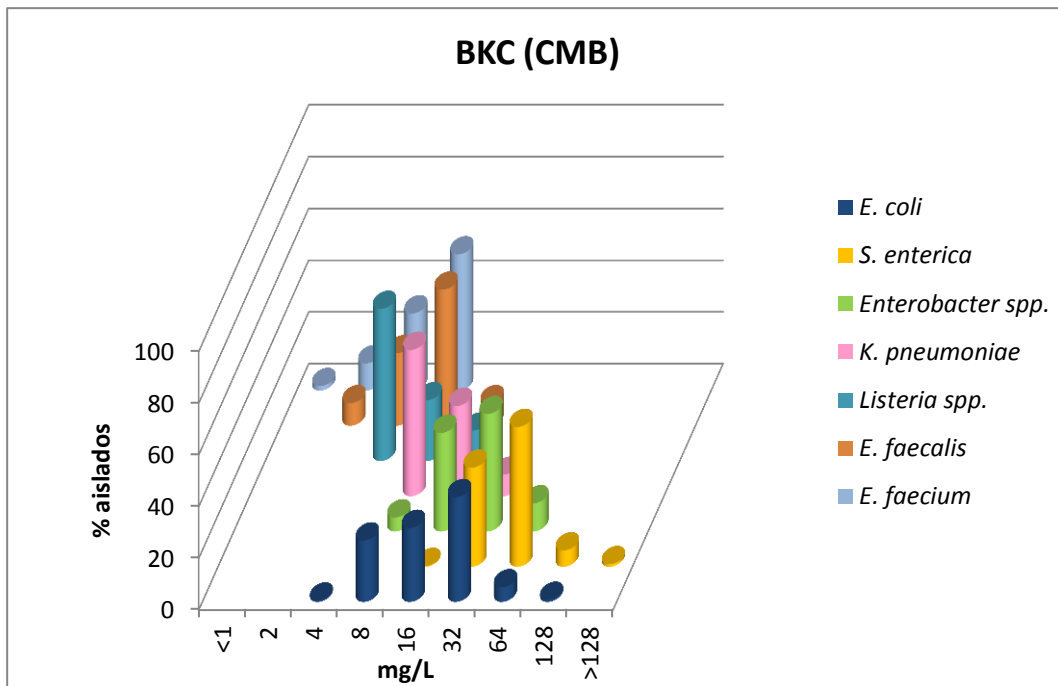
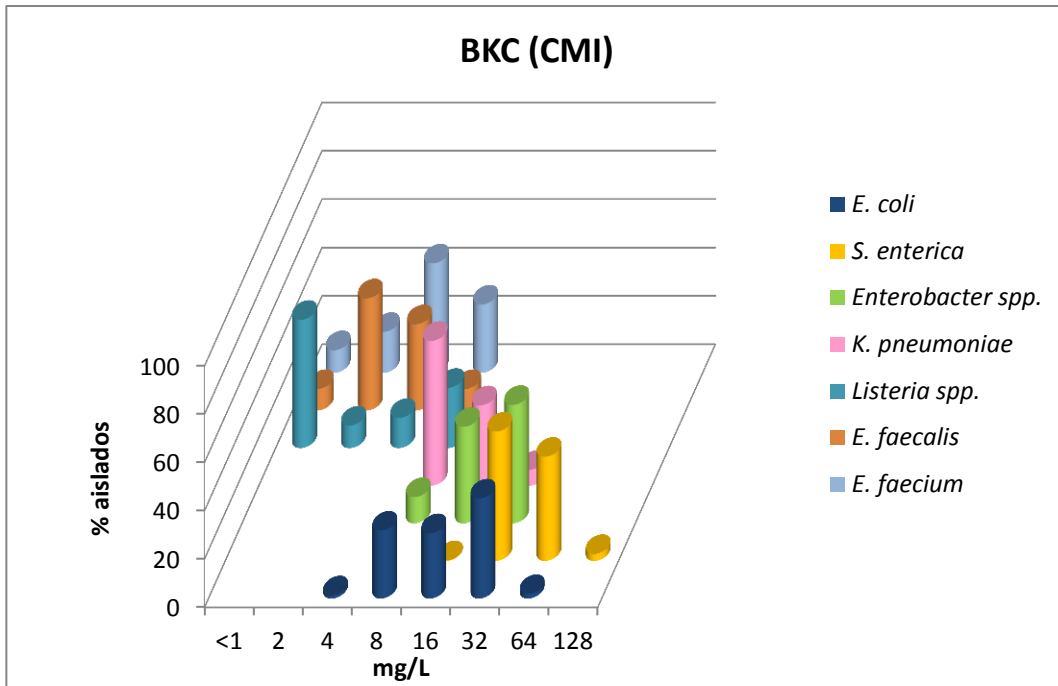
La ausencia de distribuciones de CMI bimodales parece indicar que el uso de biocidas no ha seleccionado subpoblaciones resistentes con valores de CMI superiores a los ECOFFs identificados.

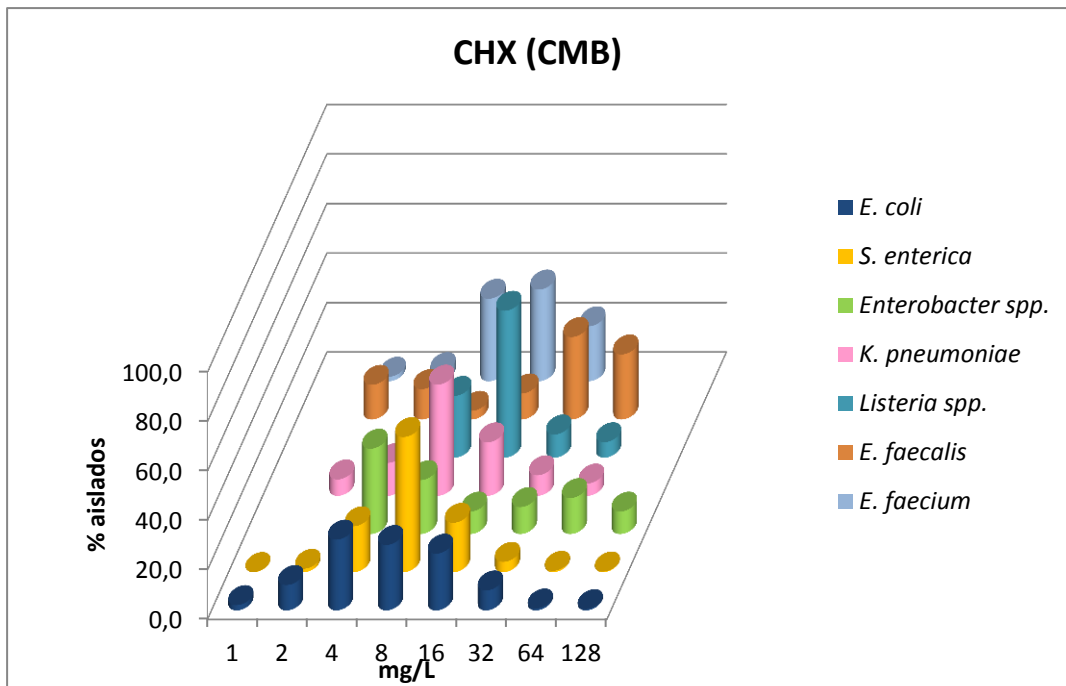
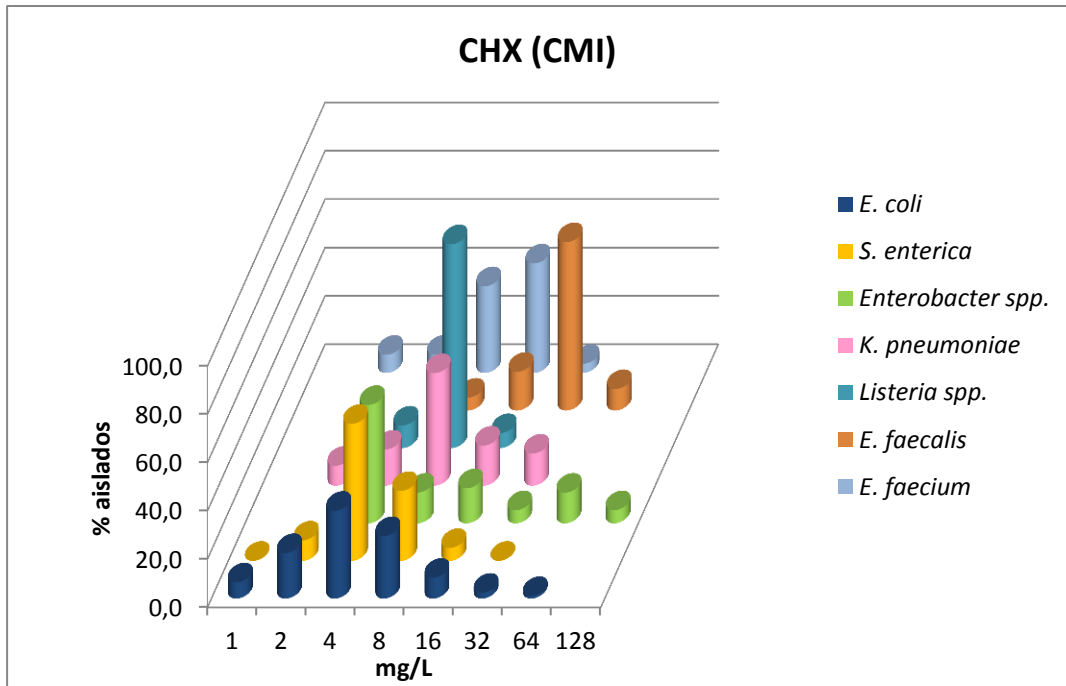
Tabla 25. Distribución de los valores de CMI, CMBs y puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) a biocidas para las especies de *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Listeriaceae* y *Enterococcaceae*.

Especies	N	Triclosan					CHX					BKC					NaOCl				
		CMI		CMB		ECOFF	CMI		CMB		ECOFF	CMI		CMB		ECOFF	CMI		CMB		ECOFF
		50	90	50	90		50	90	50	90		50	90	50	90		50	90	50	90	
<i>S. enterica</i>	901	0,06	0,12	1	2	8	32	64	64	64	64	16	16	16	32	64	4,1	8,2	4,1	8,2	16,4
<i>E. coli</i>	368	0,12	0,5	1	4	2	4	16	8	16	64	16	32	16	32	64	4,1	8,2	4,1	8,2	16,4
<i>K. pneumoniae</i>	60	0,12	1	1	2	1	8	32	8	>32	32	8	16	8	16	64	8,2	8,2	8,2	8,2	16,4
<i>Enterobacter spp.</i>	54	0,12	0,5	1	2	1	8	64	8	64	32	16	32	32	64	64	8,2	8,2	8,2	8,2	16,4
<i>S. aureus</i>	1635	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	2	4	4	8	8	2	4	2	4	16	1	2	2	4,1	4,1
<i>Listeria spp.</i>	32	4	4	8	16	8	8	8	16	32	16	<1	8	4	8	16	8,2	8,2	8,2	16,4	16,4
<i>E. faecium</i>	53	8	8	16	16	16	8	16	16	32	32	4	8	4	8	16	8,2	8,2	8,2	16,4	16,4
<i>E. faecalis</i>	56	8	8	16	16	16	32	32	32	64	64	2	4	8	8	16	8,2	16,4	16,4	16,4	16,4

Las concentraciones de triclosan, CHX y BKC están expresadas en mg/L. La concentración de NaOCl esta expresada en g/L de cloro activo.







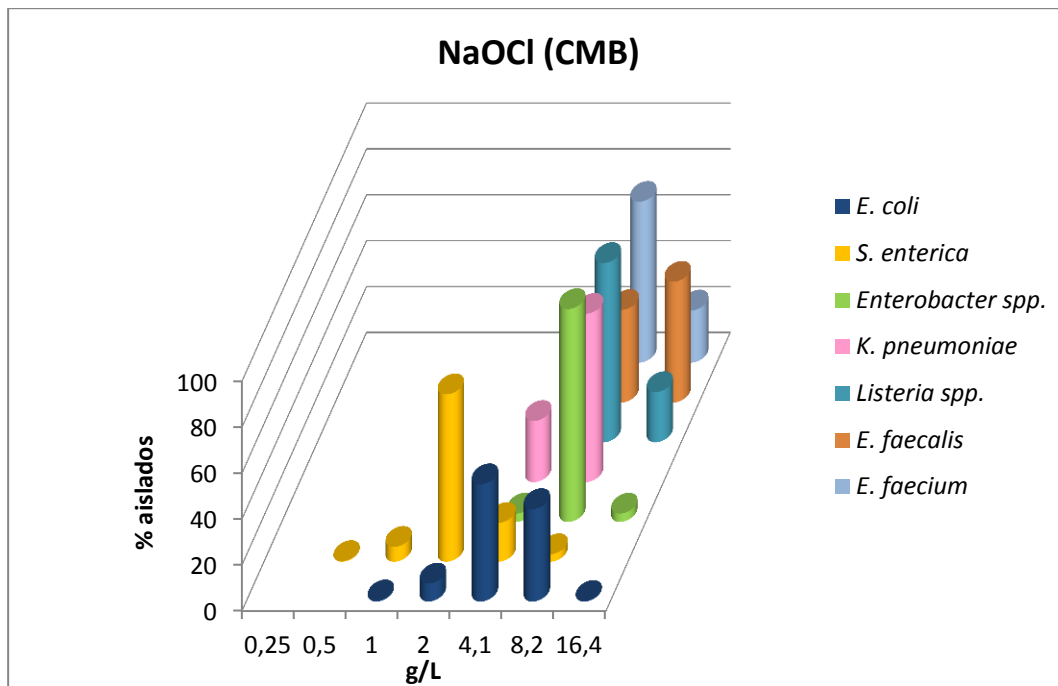
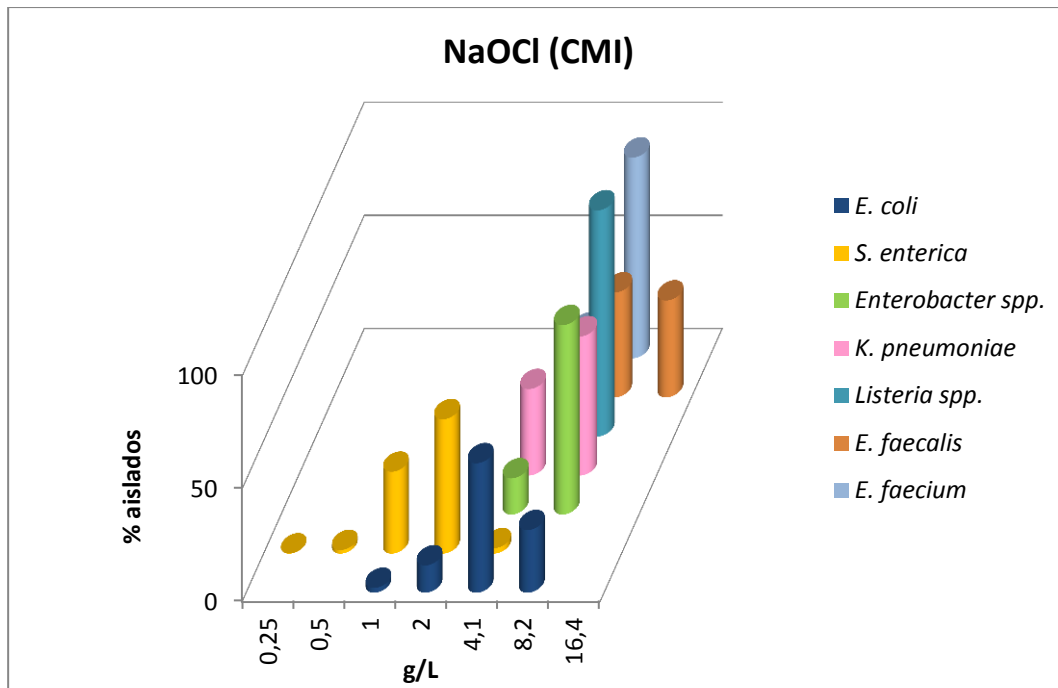


Figura 25. Distribuciones de los valores de CMI y CMBs al triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina e hipoclorito de sodio para diferentes especies de gramnegativos y grampositivos.

E. coli (n=368), *S. enterica* (901), *Enterobacter spp.* (n=54), *K. pneumoniae* (n=60); *Listeria spp.* (n=32), *E. faecium* (n=53) y *E. faecalis* (n=56).

4.2.2. Sensibilidad de biocidas en *E. coli*

La actividad de biocidas en relación a los **ecotipos** de una especie y a la **sensibilidad a antibióticos** fue analizada para *E. coli*.

Los ecotipos de *E. coli*. (A, B1, B2, D), de variable patogenicidad y especificidad de hospedador, parecen exhibir una diferente sensibilidad a biocidas. Un mayor número de aislados de los filogrupos A y B1, asociados a la microbiota de individuos sanos, animales y muestras medioambientales, presentó valores de CMI para TRI, CHX y BKC más elevados que los aislados pertenecientes a los filogrupos B2 y D, los cuales están asociados mayoritariamente a infecciones extraintestinales de humanos (Figura 26). Las cepas con valores de CMI más elevadas al TRI y CHX fueron clones de los sub-grupos A₀ y B2₂, ecotipos filogenéticamente asociados a un probable origen medioambiental (225). Por otra parte, para NaOCl no se observó dicha asociación.

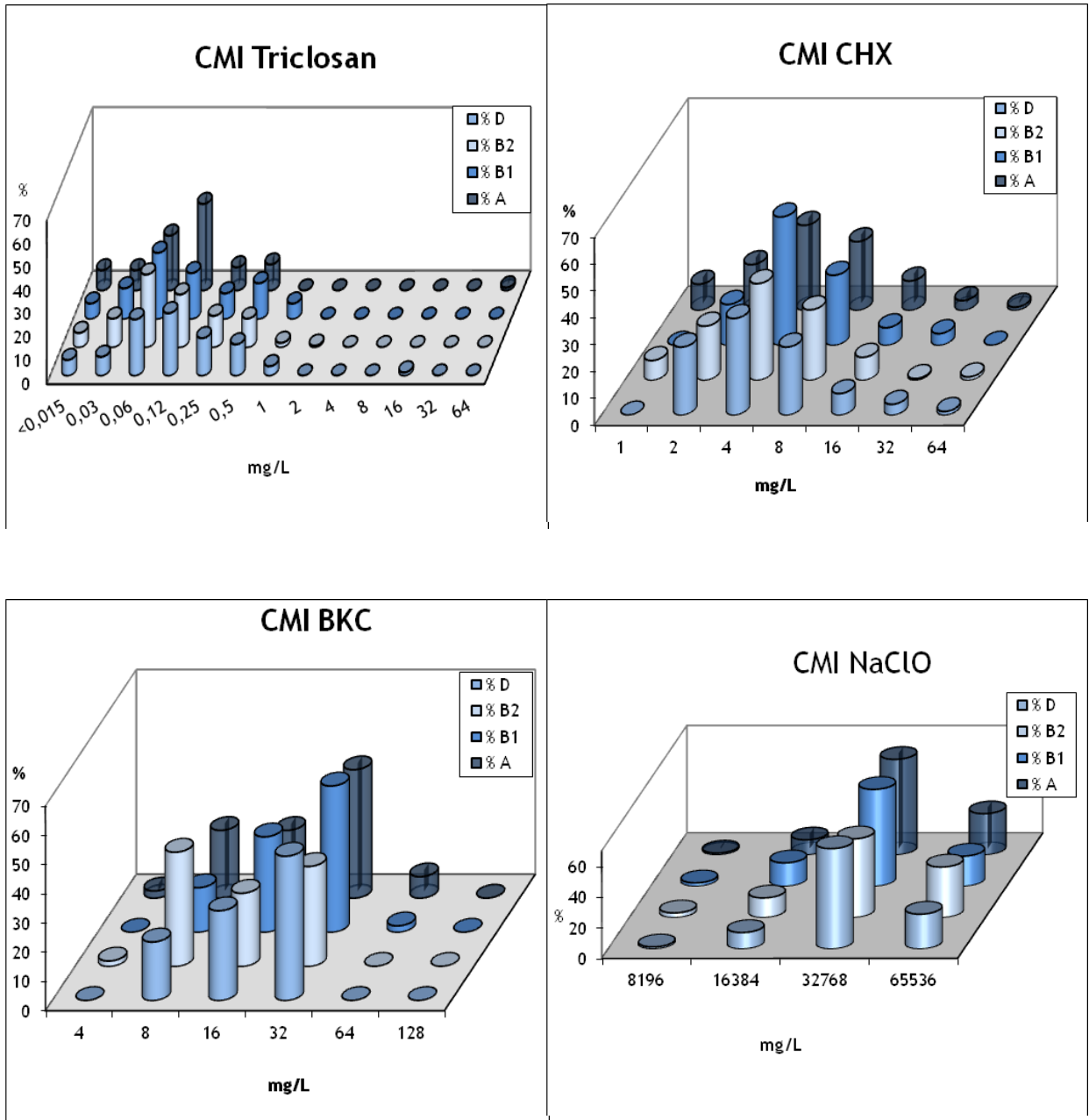


Figura 26. Distribuciones de CMIs al triclosan, cloruro de benzalconio, clorhexidina e hipoclorito de sodio según los grupos filogenéticos de *E. coli*.

4.2.3. Relación con la sensibilidad a antibióticos

Se evaluó la relación entre la sensibilidad a biocidas y la sensibilidad a antibióticos (ciprofloxacino y cefalosporinas de tercera generación) para la especie *E. coli*. Estos antibióticos se utilizan como terapia de primera elección para el tratamiento de diferentes infecciones producidas por este microorganismo, incluyendo infecciones complicadas del tracto urinario, neumonía y bacteriemia tanto en el medio hospitalario como extrahospitalario. La asociación entre resistencia a biocidas y a estos antibióticos ha sido observada anteriormente debiéndose, bien a bombas de eflujo que expulsan biocidas y antibióticos (e.g. AcrAB que provoca disminución de sensibilidad a biocidas y a antibióticos como ciprofloxacino), o bien a integrones de clase 1 que portan genes *qac*, que confieren resistencia a QACs y a diferentes familias de antibióticos. Los genes *bla* pueden estar asociados a integrones localizándose habitualmente en plásmidos conjugativos (303).

El análisis comparativo de la sensibilidad a los 4 biocidas para *E. coli* sensibles y resistentes a antibióticos aparece en la Figura 27. Las cepas sensibles y resistentes a ciprofloxacino o β -lactámicos (cepas con BLEE) se distribuyeron de forma similar entre los diferentes valores de sensibilidad a biocidas, no existiendo por tanto asociación entre la sensibilidad reducida a estos antibióticos y a los biocidas (Figura 27).

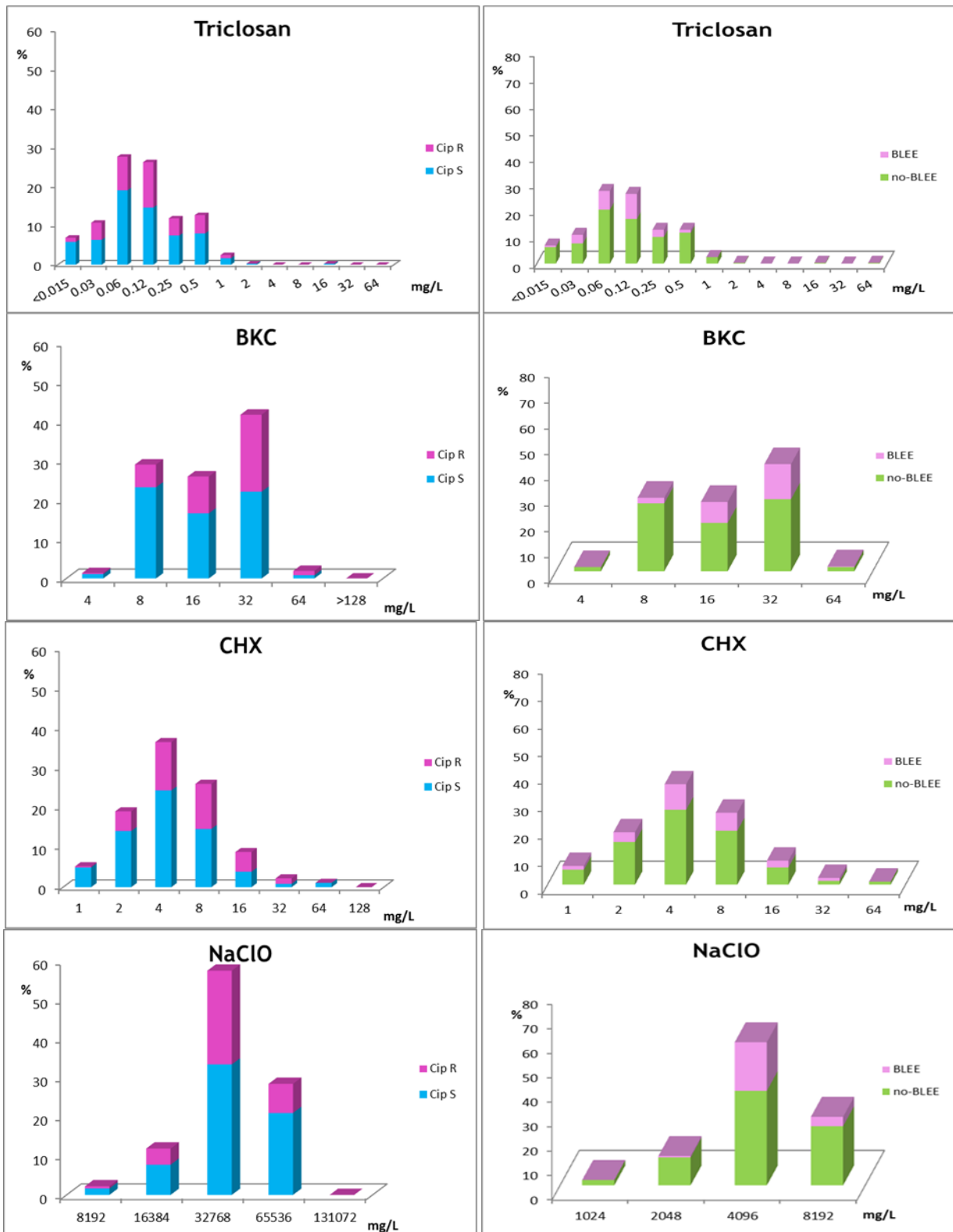


Figura 27. Distribuciones de CMI a biocidas en función de la sensibilidad antibiótica a ciprofloxacino y B-lactámicos de tercera generación (cepas con BLEE).

E. coli (n=370).

4.2.4. Discusión

Este estudio representa la primera propuesta de puntos de corte epidemiológicos para biocidas (ECOFFs), además de ser el análisis de sensibilidad a estos compuestos de mayor número de aislados de diferentes géneros y especies de relevancia en Biomedicina y Veterinaria que se ha realizado.

Las distribuciones de los valores de CMI y CMB unimodales para los distintos compuestos estudiados en las colecciones bacterianas [exceptuando para CHX (CMI y CMB) en el caso de *Enterobacter* spp.; TRI en los casos de *Enterobacter* spp. (CMB), *E. coli* (CMI y CMB) y *S. aureus* (CMI y CMB)], indican que la sensibilidad disminuida a TRI, CHX, BKC y NaOCl es infrecuente en aislados clínicos de los principales patógenos oportunistas causantes de infecciones hospitalarias y comunitarias (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. aureus*, *Listeria* spp., *E. faecalis* y *E. faecium*). Aunque estos datos son similares a los observados en estudios que han analizado algunas de las especies evaluadas en esta tesis (168,169,175,176,370), hay que subrayar que para algunos biocidas y especies, la mayoría de aislados presentó valores de CMI en un rango limitado (2-3 diluciones). El abordaje experimental, basado en la evaluación de un rango de concentraciones en progresión geométrica de acuerdo con las pautas recomendadas por el CLSI y EUCAST para la determinación de sensibilidad a antibióticos, podría limitar la detección de diversas poblaciones dentro del rango analizado. Un estudio de sensibilidad empleando un amplio rango de concentraciones en progresión aritmética permitiría confirmar las distribuciones obtenidas, pero no existen datos de otros estudios que sugieran la necesidad de este análisis.

Es de interés subrayar que los aislados con sensibilidad disminuida a TRI y BKC corresponden a cepas de *E. coli*, *Enterobacter* spp. y *S. aureus* principalmente de origen comunitario, lo cual podría estar asociado a diversas presiones de selección en diferentes ámbitos. No existen estudios sobre la relación entre sensibilidad a biocidas y la estructura poblacional de una especie, haciendo difícil establecer los nichos ecológicos más susceptibles a la aparición de resistencia. Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que los aislados de *E. coli* con un origen posiblemente medioambiental poseen menor sensibilidad a TRI, CHX y BKC que los aislados clínicos más asociados a infecciones, lo cual podría deberse a una menor exposición a biocidas de estos últimos. El TRI y los QACs se usan ampliamente como antisépticos, desinfectantes y productos domésticos de limpieza o higiene pero también como pesticidas. Los microorganismos de las especies *E. coli* y *S. aureus* constituyen la microbiota prevalente de la piel de humanos y animales y el uso de TRI en el lavado higiénico de manos y de

QACs en la desinfección de granjas podría facilitar la selección y persistencia de aislados de estas especies con reducida sensibilidad (171,371). Los vertidos industriales y su uso como pesticidas, así como el hecho de que estos compuestos no sean biodegradables los convierte en contaminantes persistentes de aguas (ríos y aguas residuales) y suelos, donde mantienen su actividad, y por tanto, ejercerían como importantes agentes de selección de bacterias con sensibilidad disminuida a ellos dentro de la comunidad (32,178).

La resistencia a biocidas es debida a determinantes genéticos de localización cromosómica (sistemas de eflujo e.g. AcrAB-TolC), o a elementos transferibles (e.g. integrones de clase 1 y/o transposones y plásmidos), ambos frecuentemente asociados a resistencia a antibióticos (372,373). La reducida sensibilidad de las enterobacterias a BKC ha sido previamente observada en aislados hospitalarios causantes de brotes epidémicos (Weber 2007). El hecho de que las enterobacterias hayan sido menos sensibles a BKC podría asociarse a la presencia de integrones de clase 1 portadores de genes *qacE* o *qacI*, tradicionalmente involucrados en la resistencia a QACs (74). Sin embargo, la presencia de integrones de clase 1 en las poblaciones de enterobacterias estudiadas en esta tesis (67,276,278,303) no se asoció a ninguna de las subpoblaciones con sensibilidad disminuida al BKC, indicando que estos genes no juegan un papel relevante en la sensibilidad a estos compuestos (ver apartado 4.1.5.). Recientemente se ha indicado que el efecto de los genes *qac* en la resistencia a BKC puede ser bajo, y que la bomba AcrAB-TolC y otras como la MdtM y las porinas, podrían contribuir más al fenotipo BKC^R (98,104,108,197).

La baja prevalencia de resistencia a biocidas implicaría que la coselección o selección cruzada por antibióticos fuese también un fenómeno infrecuente en aislados clínicos y veterinarios. Estudios *in vitro* de desarrollo de sensibilidad disminuida a biocidas demuestran cierta facilidad en la ocurrencia de mutantes a biocidas y antibióticos lo cual sugiere diferencias en la presión de selección causada por biocidas en hospitales, al menos, sobre las poblaciones causantes de infecciones (ver capítulo 4.3).

En resumen, las poblaciones naturales de enterobacterias predominantes en el ámbito hospitalario y veterinario con sensibilidad reducida a los biocidas son minoritarias, indicando un bajo riesgo de coselección entre antibióticos y biocidas en estos clones. La determinación de los puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) para biocidas descrita en este trabajo realizada dentro de un proyecto colaborativo internacional contribuirá a una mejor detección de las poblaciones con menor sensibilidad y a establecer pautas para la mejor utilización de estos compuestos.

**Influencia de la exposición a
biocidas y antibióticos sobre la
sensibilidad en Enterobacterias.**

**Estudio fenotípico y genotípico en
Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* y
Salmonella enterica tolerantes a biocidas**

4.3. INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN PREVIA A BIOCIDAS Y ANTIBIÓTICOS SOBRE LA SENSIBILIDAD DE ENTEROBACTERIAS A ESTOS COMPUESTOS: ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE *ESCHERICHIA COLI*, *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* Y *SALMONELLA ENTERICA* TOLERANTES A BIOCIDAS

Dada la baja prevalencia natural de sensibilidad disminuida a biocidas descrita en el capítulo 4.2., se analizó la aparición *in vitro* de mutantes de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enterica* tras una exposición previa a compuestos biocidas y/o antibióticos (β -lactámicos y/o ciprofloxacino). En los apartados siguientes se describe la obtención de estos mutantes, su caracterización fenotípica y genotípica y el análisis del coste biológico impuesto por el desarrollo de tolerancia a biocidas.

A partir de este estudio se originaron las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos (ver anexos 7.1.):

1. *“Selection of biocide-tolerant mutants among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae after pre-exposure to biocides or antibiotics.”*
2. *“Comparative transcriptomic and phenotypes of both biocide-tolerant mutants after pre-exposure to biocides or antibiotics and natural isolates of Salmonella enterica Typhimurium.”*
3. *“Biological cost associated to mutations that reduce susceptibility to biocides and antibiotics in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae and Salmonella enterica”* Poster presentado en 5th Federation of European Microbiological Societies FEMS, Leipzig, 2013

4.3.1. Obtención y caracterización de mutantes con sensibilidad alterada a biocidas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*)

Este apartado describe la diversidad de mutantes con sensibilidad alterada a biocidas de tres cepas de enterobacterias (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enterica*) originalmente sensibles a antibióticos y biocidas, tras su exposición a estos compuestos (Tabla 10 en Material y Métodos). El fenotipo y origen de los mutantes obtenidos se describen en la Tabla 26.

Mutantes con fenotipos de sensibilidad reducida. En general, la tolerancia a TRI y/o BKC fue más frecuente que la correspondiente a CHX (30, 29 y 14 mutantes, respectivamente). La *disminución de sensibilidad a TRI* se asoció mayoritariamente a la de BKC, BKC y CHX pero no a la disminución de la sensibilidad a CHX (mutantes obtenidos: 13 TRI^RBKC^R, 10 TRI^RBKC^RCHX^R, 4 TRI^RCHX^{HS}, 1 TRI^R). Estos fenotipos fueron observados en todas las especies siendo predominantes en *Kp* (16 *Kp*, 7 *Ec* y 5 *Sal*). La *disminución de sensibilidad a BKC* fue también frecuente, ligada a la resistencia a TRI y/o CHX (los mencionados mutantes, 13 TRI^RBKC^R, 10 TRI^RBKC^RCHX^R, y además 4 TRI^SBKC^RCHX^R y 2 BKC^R). También fue observada para todas las especies aunque fue mayoritaria en *Kp* y *Sal* (16 *Kp*, 11 *Sal*, 2 *Ec*). La *tolerancia a CHX* apareció siempre ligada a la de TRI y/o BKC y no fue detectada en *Ec* (8 *Sal*, 6 *Kp*).

Mutantes con fenotipos de sensibilidad aumentada. La generación de mutantes con sensibilidad a biocidas aumentada fue menos frecuente, generalmente asociada a TRI y CHX y esporádicamente a BKC (13, 6 y 2 mutantes, respectivamente). Los fenotipos de hipersensibilidad a TRI fueron diversos (TRI^{HS}, TRI^{HS}BKC^{HS}, TRI^SCHX^S y TRI^SBKC^RCHX^R, y restringidos a *Kp* y *Sal* (6 y 7, respectivamente). En *Kp* el aumento de sensibilidad a TRI se asoció con mutantes obtenidos tras su selección con altas concentraciones de CHX. Los fenotipos de hipersensibilidad a CHX se asociaron a tolerancia o hipersensibilidad a TRI (TRI^RCHX^{HS}, TRI^{HS}CHX^{HS}) y fueron identificados en todas las especies. La hipersensibilidad a BKC fue esporádica, representada solamente por dos mutantes *Kp* de fenotipo TRI^{HS}BKC^{HS}.

Estabilidad de mutantes. Todos los mutantes obtenidos en este estudio fueron estables después de aproximadamente 50 generaciones en medio rico no selectivo. La frecuencia de mutación fue más elevada cuando la preexposición se hizo con ciprofloxacino (10^{-9} - 10^{-5}) respecto a otro antimicrobiano (10^{-11} - 10^{-9}). Hay que subrayar que los mutantes de la mayoría de los fenotipos de sensibilidad disminuida (TRI^RBKC^R,

TRI^RBKC^RCHX^R, TRI^RCHX^{HS}) y algunos de los de sensibilidad aumentada a TRI (TRI^{HS}BKC^{HS} y TRI^SCHX^RBKC^R), fueron obtenidos con y sin exposición previa a biocidas y antibióticos.

Los valores de sensibilidad a biocidas variaron significativamente (1 a 6 diluciones) entre los mutantes con los fenotipos mayoritarios (mutantes TRI^RBKC^R y TRI^RCHX^S de *Ec*, mutantes TRI^RBKC^RCHX^R de *Sal*). En el resto de los casos las variaciones fueron de 1 a 2 diluciones.

Sensibilidad cruzada de biocidas y antibióticos.

Los perfiles de *sensibilidad a antibióticos* (número de antibióticos y valores de CMI) fueron también variables entre los mutantes con un fenotipo común de resistencia a biocidas, bien entre mutantes de la misma (TRI^RCHX^{HS}, TRI^{HS}BKC^RCHX^R, TRI^{HS}CHX^{HS}) o de diferente especie (TRI^RBKC^RCHX^R y TRI^RBKC^R) (Tabla 26). Los mutantes de los perfiles mayoritarios TRI^RBKC^RCHX^R y TRI^RBKC^R exhibieron una alteración de sensibilidad a un mayor número de antibióticos que los de otros fenotipos, siendo destacable las diferencias entre *Sal* y *Kp/Ec* (e.g. disminución de sensibilidad a AMP). La sensibilidad a antibióticos entre los mutantes de fenotipos TRI^RCHX^S, se alteró sustancialmente para dos mutantes con sensibilidad aumentada a CAZ y que expresaron mayor sensibilidad a AMP (*Ec*_SE/BKC2) o ERI, GEN, CLO y TET (*Ec*_Tri/Tri2). Ambos mutantes difirieron en el grado de tolerancia a TRI. Otros dos mutantes de este fenotipo apenas mostraron ligera tolerancia a CAZ (1,5 veces). Los mutantes de *Sal* con fenotipo TRI^{HS}BKC^RCHX^R mostraron ligeras variaciones en los valores de CMI a CAZ, CIP, ERI y CLO.

Se observaron también patrones comunes de sensibilidad a antibióticos entre mutantes de la misma especie pero con distinto fenotipo a biocidas. La sensibilidad a CLO y CIP estuvo disminuida para todos los mutantes de *Kp*, bien con un descenso marcado (48-128 y 2-15 veces, respectivamente) en todos los fenotipos TRI^R (TRI^RBKC^RCHX^R, TRI^RBKC^R), o bien con un descenso ligero (1,5-2 y 1,3-2 veces, respectivamente) para los fenotipos con sensibilidad aumentada (TRI^{HS}, TRI^{HS}BKC^{HS}, TRI^{HS}CHX^S). Además los mutantes de *Kp* de fenotipo TRI^R presentaron aumentada tolerancia a AMP (1,5-8 veces), CAZ (1,3-1,9 veces) y TET. Todos los mutantes de *Sal* exhibieron disminución de la sensibilidad a ERI (1,5 a 3 veces) y CLO (1,3 a 2,6 veces), y la mitad de ellos a CIP (1,5 veces). Cabe destacar que el mutante con fenotipo TRI^{HS} (*Sal*_CHX/AMP) fue el más resistente a antibióticos (AMP, CAZ, CIP, ERI, CLO y TET) y el único que mostró menor sensibilidad a AMP (4 veces).

Los cambios en la sensibilidad antibiótica fueron independientes de la exposición previa con cualquier compuesto.

La caracterización fenotípica y genotípica de los mutantes obtenidos se detalla en los siguientes apartados para su análisis con otro tipo de herramientas.

Tabla 26. Fenotipos de mutantes obtenidos *in vitro* con sensibilidad disminuida a biocidas.

Fenotipo a biocidas	Especie	N.º	Exposición previa ^a	CMI biocida (mg/L)				CMI antibiótico (mg/L)						Coste biológico (%)	Designación	N.º de mutantes
				TRI	BKC	CHX	AMP	CAZ	CIP	ERI	GEN	CLO	TET			
TRI ^R BKC ^R CHX ^R	Cepa salvaje Kp ^{39,11}	-		0,5	16	32	32	0,38	0,047	16	1	2	1,5			
		1	SE, TRI, CHX, BKC, NaOCl, Amp	2	32	64	64	0,75	0,094	16	1	128	4	11	Kp_Amp/Tri2	6
		2		2	32	64	-	-	0,38	-	-	-	-	9	Kp_SE/Cip	
		3		2	32	64	>256	0,5	0,5	16	1,5	>256	8	8	Kp_Tri/Cip	
		4		2	32	64	-	-	0,38	-	-	-	-		Kp_CHX/Cip	
		5		2	32	64	-	-	0,25	-	-	-	-		Kp_BKC/Cip	
		6		2	32	64	128-192	0,75	0,5	32-48	1,5	>256	16-24	15	Kp_NaOCl/Cip	
TRI ^R BKC ^R	Cepa salvaje Sal ^{SL1344}	-		0,06	16	16	1,5	0,5	0,032	16	1,5	1,5	1,5			
		1	NE, BKC, CHX	2	32	32	1,5	0,38	0,047	32-48	1,5	4	1,5	18	Sal_SE/Tri1	4
		2		0,12	32	32	1	0,25	0,047-0,064	64	0,75		8	52	Sal_SE/CHX2	
		3		0,12	32	32	-	-	-	-	-	-	-		Sal_BKC/Amp	
		4		0,12	32	32	1	0,5	0,032	48	1,5	2	1		Sal_CHX/BKC3	
TRI ^R BKC ^R	Cepa salvaje Ec ^{HEC30}	-		0,06	16	8	>256	0,25	0,023	16	1-1,5	6	2			
		1	Cip, NaOCl	1	32	8	>256	0,75	0,75	16	1	12	0,75	75	Ec_Cip/Cip	2
		2		0,12	32	4	-	-	-	-	-	-	-		Ec_NaOCl/BKC1	
TRI ^R CHX ^S	Cepa salvaje Kp ^{39,11}	-		0,5	16	32	32	0,38	0,047	16	1	2	1,5			
		1	SE, TRI, BKC, CHX, NaOCl, Ab	2	32	32	32	0,5	0,38	16	1	>256	4		Kp_SE/Tri2	10
		2		2	32	32	64	0,5	0,38	12	1	128	6	4	Kp_Tri/Tri2	
		3		2	32	32	48	0,5	0,38	12	1	128	4		Kp_BKC/Tri2	
		4		2	32	32	32	0,5	0,5	16	1	>256	4		Kp_CHX/Tri2	
		5													Kp_NaOCl/Tri2	
		6		2	32	32	32		0,5	32	1		24-32		Kp_Cip/Tri2	
		7		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		Kp_Tri/BKC1	
		8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		Kp_BKC/BKC1	
		9		2	32	32	>256	1,5	0,75	>256	0,19	96	12	66	Kp_Cip/BKC2	
	10		2	32	32	-	-	-	-	-	-	-		Kp_Amp/Cip		
	Cepa salvaje Sal ^{SL1344}	-		0,06	16	16	1,5	0,5	0,032	16	1,5	1,5	1,5			
		5	BKC	0,12	32	16									Sal_BKC/BKC3	1
	Cepa salvaje Ec ^{HEC30}	-		0,06	16	8	>256	0,25	0,023	16	1-1,5	6	2			
		1	SE, TRI	4	16	2	>256	0,13	0,032	1	0,75	3	1	26	Ec_Tri/Tri2	4

Fenotipo a biocidas	Especie	N.º	Exposición previa ^a	CMI biocida (mg/L)				CMI antibiótico (mg/L)						Coste biológico (%)	Designación	N.º de mutantes	
				TRI	BKC	CHX	AMP	CAZ	CIP	ERI	GEN	CLO	TET				
TRI ^R	Cepa salvaje <i>Sal</i> ^{SL1344}	2		1	16	4	>256	0,38	0,023	16	1-1,5	6	2	1	Ec_SE/Tri1		
		3		0,12	16	4	>256	0,38	0,047	12	1,5	6	1,5	0,6	Ec_Tri/BKC1		
		4		0,12	16	2	2	0,12	0,032	16	1,5	6	1,5		Ec_SE/BKC2		
		1	BKC	0,25	16	8	>256	0,5	0,032	16	1,5	4-12	1,5	6	Ec_BKC/BKC2	1	
		-		0,06	16	16	1.5	0.5	0,032	16	1,5	1,5	1,5				
BKC ^R		6	Cip, TRI	0,06	32	16	1,5	0,5	0,032	24	1,5	2-3	1,5	SC	Sal_Cip/Tri1	2	
TRI ^{HS} BKC ^R CHX ^R	Cepa salvaje <i>Kp</i> ^{39,11}	7		0,06	32	16	2	0,5	0,032	32	1,5	3	1,5	22	Sal_Tri/BKC3		
		8	SE, TRI, BKC	0,03	32	32									Sal_SE/BKC2		
		9		0,03	32	32	1,5	0,75	0,047	24	1,5	3	1,5	5	Sal_SE/BKC3		
		10		0,015	32	32	1,5	0,5	0,032	24	1,5	2	1,5		Sal_Tri/Amp		
		11		0,015	64	32	-	-	-	-	-	-	-	-		Sal_BKC/CHX2	
TRI ^{HS} BKC ^{HS}	Cepa salvaje <i>Kp</i> ^{39,11}	1	SE, CAZ	0,12	8	32	48	0,25	0,094	16	1,5	3	2	SC	Kp_SE/CHX2	2	
		2		0,25	8	32	32	0,25-0,38	0,094	16	1-1,5	4	2		Kp_CAZ/CHX2		
TRI ^S CHX ^S	Cepa salvaje <i>Sal</i> ^{SL1344}	1	CIP	0,12	16	16	32	0,25-0,38	0,094	16	1	4	1,5	SC	Kp_Cip/CHX2	1	
		-		0,06	16	16	1,5	0,5	0,032	16	1,5	1,5	1,5				
TRI ^{HS}	Cepa salvaje <i>Kp</i> ^{39,11}	12	Cip	0,03	16	8	>256	1,5	0,032	48	2	-	1,5	SC	Sal_Cip/CHX1	1	
		1	TRI, BKC, NaOCl	0,25	16	32										Kp_Tri/CHX2	3
		2		0,25	16	32	32	0,25	0,064	16	1,5	4	2		Kp_BKC/CHX2		
		3		0,25	16	32										Kp_NaOCl/CHX2	
		-		0,06	16	16	1,5	0,5	0,032	16	1,5	1,5	1,5				
		13	BKC, CHX	0,015	16	16	1,0	2	0,032	64	1,5	-	1,5	-	Sal_BKC/Cip	2	
		14		0,015	16	16	6	1,5	0,047	24	1,5	4	3	44	Sal_CHX/Amp		

^a la exposición previa a concentraciones subinhibitorias de los biocidas y antibióticos estudiados. SE, Sin Exposición previa (véase apartado 3.6.1. de Material y Métodos); SC, sin coste; - No testado.

Los superíndices S y R se refieren únicamente a incremento (S-sensible, menor CMI) o disminución de la sensibilidad (R-resistente, mayor CMI) a los antimicrobianos, respecto a la sensibilidad de la cepa salvaje, no se basan en ninguno punto de corte. TRI: triclosan, CHX: clorhexidina, BKC: cloruro de benzalconio, NaOCl: hipoclorito sódico, AMP: ampicilina, CAZ: ceftazidina, CIP: ciprofloxacino, ERI: eritromicina, GEN: Gentamicina, CLO: cloranfenicol, TET: tetraciclina.

4.3.2. Análisis de fenotipos de sensibilidad a antimicrobianos utilizando microarrays fenotípicos (Biolog PM11 y PM20)

La actividad antimicrobiana fue analizada frente a un panel más amplio de compuestos en 18 mutantes (6 *Ec*, 5 *Kp* y 7 *Sal*) correspondientes a los 9 fenotipos con sensibilidad alterada a biocidas (Tabla 27) usando el microarray fenotípico Biolog PM11-PM20 (Biolog, Hayward, California, EEUU).

Tabla 27. Mutantes analizados por microarrays fenotípicos (Biolog PM11-20).

Fenotipo	<i>Ec</i> (n=6)	<i>Kp</i> (n=5)	<i>Sal</i> (n=7)
TRI ^R BKC ^R	1 (Cip/Cip)	2 (Cip/BKC2, Tri/Tri2)	
TRI ^R	1 (BKC/BKC2)		
TRI ^R CHX ^S	4 (SE/TRI1, Tri/Tri2, TRI/BKC1, SE/BKC2)		
BKC ^R			1 (TRI/BKC3)
TRI ^R BKC ^R CHX ^R			2 (CHX/BKC3, NE/TRI1)
TRI ^{HS} BKC ^R CHX ^R			3 (BKC/CHX2, NE/BKC3, TRI/AMP)
TRI ^S		1 (BKC/CHX2)	1 (CHX/AMP)
TRI ^S BKC ^S		1 (SE/CHX2)	
TRI ^S CHX ^S		1 (Cip/CHX2)	

Los datos de sensibilidad de los mutantes analizados de cada fenotipo TRI^RBKC^RCHX^R (2 *Sal*), TRI^RBKC^R (1 *Ec*, 2 *Kp*), TRI^R (1 *Ec*), TRI^{HS}BKC^RCHX^R (3 *Sal*), BKC^R (1 *Sal*), TRI^S (1 *Sal*, 1 *Kp*), TRI^RCHX^S (4 *Ec*), TRI^SBKC^S (1 *Kp*), TRI^SCHX^S (1 *Kp*) aparecen en la Tabla 28 pudiendo inferirse modificaciones en diferentes dianas celulares.

El análisis detallado de la sensibilidad a antimicrobianos utilizando el microarray Biolog mostró diferencias intra e interespecie para fenotipos de sensibilidad a biocidas similares.

La frecuente aparición de resistencia a inhibidores de la síntesis proteica (anfencoles, tetraciclinas, macrólidos y otros), de la síntesis de ADN (inhibidores de la ADN topoisomerasa e intercalantes de ADN), de la síntesis de la pared celular (β -lactámicos) y el aumento de sensibilidad a agentes que afectan la permeabilidad de la membrana (colistina, polimixina B, aminoglicósidos, poli-L-lisina y aniones, cationes y paraquat) con diferentes mecanismos de acción refleja una síntesis proteica aumentada y la alteración de los mecanismos de homeostasis del ADN y de la síntesis de la pared y la membrana celular.

Más específicamente, los mutantes de *Ec* fueron mayoritariamente resistentes a cefalosporinas [con la excepción del mutante TRI^RCHX^S (*Ec*_SE/BKC2)] como cefoxitina y cefuroxima, tetraciclinas y QACs (sanguinarina, bromuro de dodeciltrimetil amonio, dequalinio) y más sensibles a compuestos que aumentan la permeabilidad de la membrana (e.g. polimixina B, aminoglicósidos). Los mutantes de *Kp* exhibieron una menor sensibilidad a antibióticos que actúan sobre la pared celular (penicilina G), inhibidores de síntesis de DNA (novobiocina, una aminocumarina que inhibe la *gyrB*, más marcadamente que las fluoroquinolonas), la síntesis de proteínas (derivado de tetraciclinas) y una mayor sensibilidad a otros que interfieren sobre la permeabilidad celular (colistina, metil viológeno o paraquat, aniones tóxicos como cobalto). Todos los mutantes de *Ec* y *Kp* estudiados fueron más resistentes al pesticida de uso general dodina que actúa sobre la membrana. Los mutantes de *Sal* fueron resistentes a un menor número de antimicrobianos de cada familia que los mutantes de *Ec* y *Kp* pero igualmente sensibles a agentes que actúan sobre la permeabilidad de la membrana (colistina agentes catiónicos como la poli-L-lisina y aniónicos como metaborato de sodio) y la síntesis proteica (hidroxamato de D,L-metionina). La mayoría de los mutantes de *Sal* fue resistente a otro antibiótico inhibidor de la síntesis proteica (tianfenicol), trimetoprim y cationes tóxicos.

Se observaron variaciones en la sensibilidad antimicrobiana para aislados de fenotipo similar (e.g. TRI^RBKC^R en mutantes *Ec* y *Kp*) y una variación similar para mutantes de diferentes fenotipos de tolerancia a biocidas (e.g. *Ec* TRI^RBKC^R *Ec*_Cip/Cip y TRI^RCHX^S *Ec*_Tri/Tri2). Hay que destacar dos fenotipos con patrones específicos. Primero, mutantes TRI^RCHX^S (*Ec*_SE/Tri1 y *Ec*_Tri/BKC1) que fueron resistentes a un mayor número de compuestos inhibidores de la respiración celular y a un catión tóxico (litio). Segundo, mutantes de *Kp* TRI^RBKC^R (*Kp*_Cip/BKC2 y *Kp*_Tri/Tri2) resistentes a un elevado número de compuestos (57 y 58, respectivamente, 52 de ellos comunes) de diferentes familias que incluyen los inhibidores de ADN topoisomerasa testados (n=8), inhibidores de la síntesis proteica [e.g. anfenicoles (n=2); tetraciclinas (n=5), puromicina], inhibidores de la síntesis de la pared [cefalosporinas (n=9) y otros β-lactámicos], agentes con actividad sobre la membrana (alexidina, amitriptilina, QACs-sanguinarina, bromuro de dodeciltrimetil-amonio, cloruro de benzetonio y bromuro de domifeno), antagonistas del folato (n=4), inhibidores de la respiración celular (n=3), intercalante de ADN (4-hidroxicumarina), quelantes (n=3) y aniones tóxicos (n=3), con ausencia de cambios en presencia de aminoglicósidos.

Los mutantes con fenotipos de aumento de sensibilidad TRI^S , TRI^SBKC^S y TRI^SCHX^S , exhibieron similar sensibilidad que la cepa salvaje a otros QACs y β -lactámicos pero mayor sensibilidad frente a cefalosporinas, algunos inhibidores de ADN topoisomerasas, algunas tetraciclinas y agentes con actividad sobre la membrana (alexidina). El fenotipo TRI^S en *Kp* fue el más sensible a un elevado número de antimicrobianos (n=25) y resistente a un menor número de compuestos (n=11), indicando que en esta especie el aumento de sensibilidad a TRI conlleva al aumento de sensibilidad a variedad de otros antimicrobianos. En *Sal* este fenotipo fue el único con mayor sensibilidad a neomicina (aminoglicósido) sin embargo fue menos sensible a colistina y cromato de potasio.

Tabla 28. Principales cambios de sensibilidad a compuestos antimicrobianos para los mutantes a biocidas (Biolog PM11-20).

Mecanismos de acción	Compuestos	<i>E. coli</i> (n=6)		<i>K. pneumoniae</i> (n=5)		<i>S. enterica</i> (n=7)	
		TRI ^R TRI ^R BKC ^R T RI ^R CHX ^S	TRI ^R BKC ^R , TRI ^R CHX ^S	TRI ^S , TRI ^S BKC ^S , TRI ^S CHX ^S	TRI ^R BKC ^R	BKC ^R , TRI ^{HS} BKC ^R CHX ^R TRI ^S TRI ^R BKC ^R CHX ^R	TRI ^R BKC ^R CHX ^R (n=1) TRI ^{HS}
Actividad sobre membrana	Penicilina G/β-lactámicos	R	R	R/NV	R	S/R/NV	
	Cefalosporinas	R		S/NV	R	NV	
	QACs	R		NV	R	S	
	Guanidinas				R		
	Polimixina B	S	S	NV	R		
	Colistina			S	S	S	R (TRI ^{HS})
	Otros			S (alexidina)	R	S (poli-L-lisina)	
Oxidantes / Tóxicos	Metil viológeno			S		S	
	Aniones		S	S	R (Te, IO ₄)	S (BO ₂)	
	Cationes	NV	S (Li, Alu)	S (Co)		R/NV	
Inhibidores de la síntesis proteica	Anfenícoles	R	R	NV	R	R (tianfenicol)	
	Tetraciclinas	R		R	R	S/NV	
	Macrólidos		R	(penimepiciclina)	R (n=1)		
	Aminoglicósidos	S-NV	S		S	S/R (neomicina)	S (TRI ^{HS})
	Cinoxacina/Puromicina	R		NV	R		
Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	Hidroxamato D,L-metionina			NV		S	
	Novobiocina			R	R	NV	NV
Intercalantes ADN	Quinolonas		R (TRI ^R BKC ^R)	S/NV	R	S/R	R
	4-hidroxicumarina, otros		S		R		
Quelantes	Acridina, acriflavina	NV	S		R		
	1,10-fenantrolina		R	NV	R	S/NV	
Inhibidores de ruta del ác. fólico	2,2'-Dipiridil				R		
	Trimetoprim			NV	R	R	
Inhibidores de la respiración	Sulfadiazina						
	Violeta tetrazolio			NV	R		
	Tioridazina				R		

R: menor sensibilidad, S: mayor sensibilidad y NV: no variable. Li: litio, Alu: aluminio, Te: telurito, IO₄: periodato; Co. Cobalto; BO₂: metaborato.

4.3.3. Análisis metabólico para los mutantes de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Biolog PM1 y PM2)

La utilización de sustratos como fuentes de carbono y de nitrógeno fue significativamente diferente para mutantes de *Ec* y de *Kp* y sus respectivas cepas salvajes (Tablas 29 y 30). Se establecieron diferentes grupos de mutantes en cada especie atendiendo a sus perfiles metabólicos (Tablas 29 y 30). Todos los **mutantes de *Ec*** analizados (fenotipos $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}$, $\text{TRI}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{S}}$ y TRI^{R}) metabolizaron mejor el ácido málico que la cepa salvaje. Dos mutantes, $\text{TRI}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{S}}$ *Ec*_Tri/Tri2 y $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}$ *Ec*_Cip/Cip presentaron un patrón metabólico común fuertemente asociado a una utilización más eficiente del **aminoácido** hidroxil-L-prolina, **ácidos carboxílicos** (ácidos D-glucosamínico, tartárico, cítrico, citracónico, γ -amino-N-butírico, D, L-citramálico, β -hidroxibutírico, quínico, succinámico, L-piroglutámico, D,L-carnitina), **azúcares** (adonitol, m-inositol, D-arabitol, D-celobiosa) y de **alcoholes** 1,2-propanodiol y 2,3-butanodiol. Todos excepto los mutantes $\text{TRI}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{S}}$ (*Ec*_SE/BKC2) y TRI^{R} (*Ec*_BKC/BKC2) utilizaron más eficientemente arbutina, y uno de ellos metabolizó también salicilina.

Todos los **mutantes de *Kp*** estudiados excepto el de fenotipo $\text{TRI}^{\text{S}}/\text{CHX}^{\text{S}}$ metabolizaron mejor que la estirpe salvaje la D-alaninamida pero no los compuestos tween 80, γ -ciclodextrina y ácido 3-metilglucurónico. Los mutantes de fenotipos $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ y $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}$ (*Kp*_Cip/BKC2) usaron menos eficientemente que la cepa salvaje algunos azúcares (D-melezitosa, D-amigdalina), ácidos carboxílicos (ácido citramálico, oxomálico y oxólico), aminoazúcares componentes del peptidoglicano (ácido D-glucosamínico, N-acetilneuramínico y N-acetilgalactosamina) y el 1,2-propanodiol. Mutantes $\text{TRI}^{\text{S}}\text{CHX}^{\text{S}}$ o $\text{TRI}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$ también utilizaron menos que la cepa salvaje al menos 2 aminoazúcares constituyentes del peptidoglicano (ácido D-glucosamínico/ N-acetil D-glucosamina y ácido N-acetilneuramínico) (Tabla 30). Los mutantes $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}$ (*Kp*_Cip/BKC) y $\text{TRI}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$ con marcada diferencia de sensibilidad a antimicrobianos presentaron un perfil metabólico similar en lo que respecta a sustratos usados más eficientemente (ornitina) y menos eficientemente (β -D-alosa, D-melezitosa, amigdalina, D-arabinosa y sedoheptulosa) que por la estirpe salvaje.

Los mutantes a biocidas de *Kp* con cambios más pronunciados en la sensibilidad antibiótica (*Kp*_Cip/BKC2 y *Kp*_NaOCl/Cip), presentaron como único rasgo distintivo la peor metabolización de la L-glucosa.

Los mutantes de *Ec* metabolizaron más eficientemente un mayor número de sustratos que los mutantes de *Kp*, independientemente de los fenotipos a biocidas.

Tabla 29. Perfiles metabólicos de los mutantes de *E. coli* (Biolog PM1 y 2).

Mutantes <i>E. coli</i>	<i>Ec_Tri/BKC1</i>	<i>Ec_SE/BKC2</i>	<i>Ec_Tri/Tri2</i>	<i>Ec_Cip/Cip</i>	<i>Ec_SE/Tri1</i>	<i>Ec_BKC/BKC2</i>
Fenotipo a biocidas	TRI ^R (2 x), CHX ^{HS} (0,5 x)	TRI ^R (2 x) CHX ^{HS} (0,25 x)	TRI ^R (66 x), CHX ^{HS} (0,25 x)	TRI ^R (16 x), BKC ^R (2 x)	TRI ^R (16 x), CHX ^{HS} (0,5 x)	TRI ^R (4 x)
Fenotipo antibióticos	CIP ^R (2 x)	AMP ^{HS} (0.0078 x) CAZ ^{HS} (0.5 x)	CAZ, CLO, TET ^{HS} (0,5 x); ERI ^{HS} (0,06 x); GEN ^{HS} (0,75 x)	CAZ ^R (3 x); CIP ^R (32 x)	Sin cambios	Sin cambios
Substratos metabolizados mejor que por la cepa salvaje	Ácido D-málico ^a , ácido quinico ^e ,	ácido D-málico ^a	Hidroxi-L-prolina, ácido D-glucosaminico, ácido citrico, ácido citracónico, ácido γ-amino-N-butírico, ácido D, L-citramálico, ácido β-hydroxibutírico, ácido succinámico, ácido L-piroglutámico, ácido D-malico ^a , ácido quinico, D, L-carnitina, adonitol ^b , m-inositol, D-arabitol, D-celobiose ^c , 2,3-butanediol y 1,2-propanodiol ^d		ácido D-málico ^a	ácido D-málico ^a , ácido quinico ^e
	-	-	-	ácido m-tartarico	-	-
	Arbutina	-	Arbutina	-	Arbutina y salicilina	Arbutina
Substratos metabolizados peor que por la cepa salvaje	D-serina, b-D-alose, 1,2-propanodiol	D- serina, ácido α- ketoglutarico, ácido D- glucosaminico, 1,2- propanodiol, tween 40	-	D-psicosa, L-lixosa, b-D- alosa, ácido α- hidroxiglutarico γ-lactone, dihidroxiacetona	-	D-celobiose, ácido D- glucosaminico, ácido α-hidroxiglutarico, γ-lactone, mono- metilsuccinato, tween 20
	Adonitol Salicilina	Adonitol -	- Salicilina	- Salicilina	Adonitol -	Adonitol Salicilina

^a substratos metabolizados más rápidamente por los mutantes *Ec_Tri/Tri2* y *Ec_Cip/Cip* (a las 2h vs después de 12h); ^b adonitol metabolizado por mutantes más rápidamente que por la cepa salvaje (a las 12h vs 18/24h); ^c metabolizado por los mutantes *Ec_Tri/Tri2* y *Ec_Cip/Cip* en menor nivel que por la cepa salvaje.

Tabla 30. Perfiles metabólicos de los mutantes de *K. pneumoniae* (Biolog PM1 y 2).

Mutantes <i>K. pneumoniae</i>	Kp_BKC/CHX2	Kp_Cip/CHX2	Kp_SE/CHX2	Kp_Cip/BKC2	Kp_Tri/Tri2	Kp_Amp/Tri2	Kp_NaOCl/Cip
Fenótipo biocidas	TR ^I S (0.5x)	TR ^I HS (0.24x); CHX ^S (0.5x)	TR ^I HS (0.24x), BKC ^S (0,5x)	TR ^I R (4x), BKC ^R (2x)	TR ^I R (4x) BKC ^R (2x)	TR ^I R (4x) BKC, CHX ^R (2x)	TR ^I R (4x) BKC, CHX ^R (2x)
Fenótipo antibióticos	CLO ^R (2x)	CIP ^R (2x); CLO ^R (2x)	AMP ^R (1,5x); CIP ^R (2x)	AMP ^R (>8x); CAZ ^R (4x); CIP ^R (16x); ERI ^R (>16x); GEN ^R (0,19x), CLO ^R (48x); TET ^R (8x)	AMP (2x), CIP ^R (8x); CLO ^R (64x); TET ^R (4x)	AMP ^R (2x); CAZ ^R (1.9x); CIP ^R (2x); CLO ^R (64x); TET ^R (2.7x)	AMP ^R (6x) CAZ ^R (2x); CIP ^R (10x); ERI ^R (3x); CLO ^R (>128x); TET ^R (10.7x)
Substratos metabolizados mejor que por la cepa salvaje	Ácido D-aspártico, ácido N-acetilneuramínico - D-alaninamida ^a -	- D-arabinosa - -	- - D-alaninamida ^a L-ornitina	Ácido propiónico - D-alaninamida ^a L-ornitina	Glicógeno, D-fructosa, D-fucosa D-arabinosa D-alaninamida ^a -	- - D-alaninamida ^a -	- D-arabinosa D-alaninamida ^a L-ornitina
Substratos metabolizados peor que por la cepa salvaje	Tween 80 γ-ciclodextrina, ácido 3-metilglucurónico	Tween 80, γ-ciclodextrina, ácidos 3-metilglucurónico, D-glucosamínico, N-acetilneuramínico Ácido α-hydroxiglutarico γ-lactone ^c	Tween 20, 80 γ-ciclodextrina, ácido 3-metilglucurónico, ácido N-acetilneuramínico Ácido α- hydroxiglutarico γ-lactone ^c	Tween 40, 80 γ-ciclodextrina, ácido 3-metilglucurónico, ácido D-aspártico; D-glucosamínico, mono-metilsuccinato N-acetil D-galactosamina	Tween 80 γ-ciclodextrina, 3-ácido 3-metilglucurónico Ácido propiónico ^c	Tween 20, 40, 80 γ-ciclodextrina, ácido 3-metilglucurónico ácidos D-aspártico; D-glucosamínico, mono-metilsuccinato, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico Ácidos α-hidroxi-glutarico, γ-lactona, α-cetoglutarico, m-tartárico, bromosuccínico, propionico, glioxílico	Tween 20, 40, 80 γ-ciclodextrina, ácidos 3-metilglucurónico, D-glucosamínico ^b , N-acetil D-galactosamina, N-acetilneuramínico
				Gelatina	Gelatina		
			B-D-alosa, D-melezitosa, D-amigdalina, D-arabinosa		3-metilglucosa	D-melezitosa, D-amigdalina, D-arabinosa ^c , 3-metilglucosa	D-melezitosa ^c , D-amigdalina
			Sedoheptulosan	Sedoheptulosa, D-tagatose,		D-tagatosa, xilitol, ácido δ-aminovalérico	

	L-glucosa		L-glucosa ^c	
Ácido butírico	ácidos caproico, citracónico, citramálico, 2-hidrobenczoico, oxólico, oxomálico	Ácido butírico Ácido oxomálico	ácidos caproico, citracónico, citramálico, 2-hidrobenczoico, oxólico, oxomálico	Ácidos citramálico, oxólico, oxomálico
		Glicina D, L- carnitina	Glicina L-ornitina, L-fenilalanina	Glicina
			1,2 propanodiol	1,2 propanodiol

Los espacios en blanco significan ausencia de cambios; ^a sustratos metabolizados más rápidamente ^b empieza a ser metabolizado a las 30h, alcanzando el mismo nivel de respiración ^c metabolizado aproximadamente 50 unidades Omnilog menos que la cepa salvaje.

4.3.4. Crecimiento, coste biológico y expresión génica (RT-PCR) de mutantes con alteración de sensibilidad a biocidas.

El análisis de alteraciones en el crecimiento bacteriano y en el coste biológico se realizó en mutantes representativos de los 9 fenotipos obtenidos. Las colonias de los mutantes $TRI^R BKC^R$ (*Ec_Cip/Cip* y *Kp_Cip/BKC2*) y $TRI^R BKC^R CHX^R$ (*Kp_Amp/Tri2*, *Kp_Tri/Cip* y *Sal_SE/CHX2*) fueron más lisas, mucosas o exhibieron un menor tamaño. El análisis del perfil genómico de los mutantes con sensibilidad disminuida a biocidas representativos de los fenotipos con mayores cambios de sensibilidad antimicrobiana no indicó variaciones respecto a la estirpe salvaje (Figura 28).

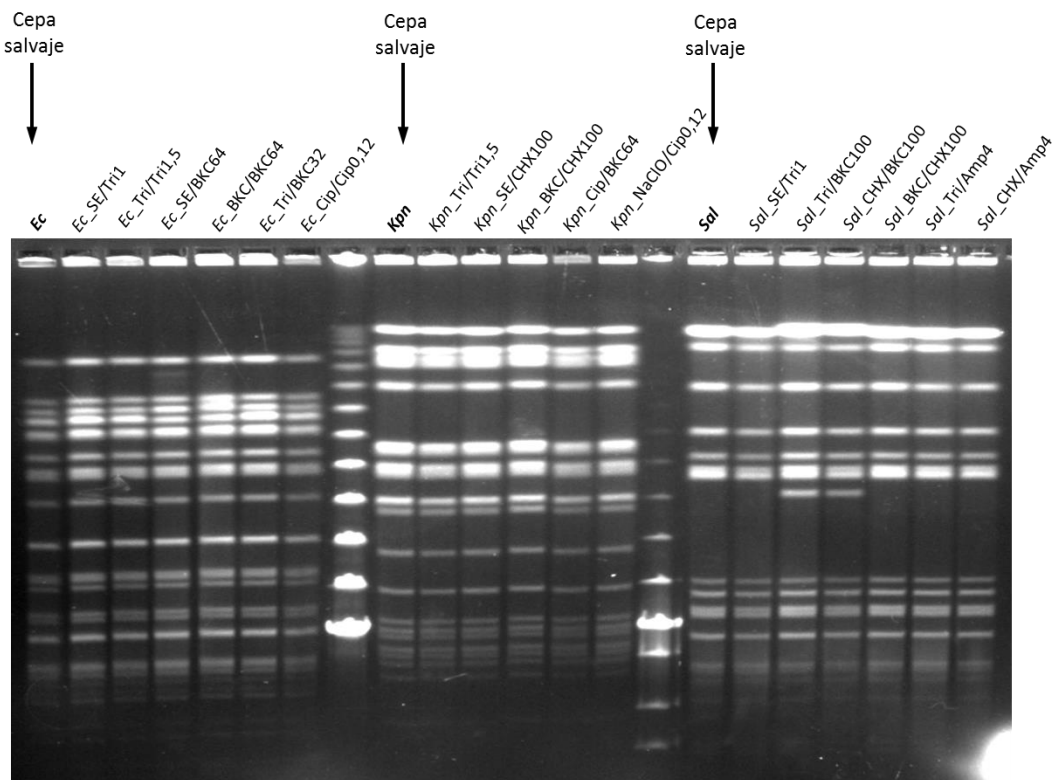


Figura 28. Perfil de campo pulsado del ADN cromosómico de las cepas salvajes y sus respectivos mutantes a biocidas, tras digestión enzimática.

Digestión con la enzima *Xba*I, 5-35s durante 21h.

El coste biológico se evaluó en ausencia de antimicrobianos para determinar la afectación de mutantes representativos de diversos fenotipos de *E. coli* (n=5), *K. pneumoniae* (n=9) y *S. enterica* (n=7) (la mayoría previamente evaluados por Biolog, véase Tabla 27 y Figura 29).

Los diferentes mutantes de *Ec* resistentes a triclosan [**TRI^RCHX^{HS}** (*Ec_Tri/Tri2*), **TRI^RBKC^R** (*Ec_Cip/Cip*) y **TRI^R** (*Ec_BKC/BKC2*)] exhibieron un variable coste biológico (26 y 75% y 6%, respectivamente) y regulación de las bombas de expulsión. El coste biológico de los dos primeros, caracterizados por destacados cambios de sensibilidad a TRI, ERI o CIP, fue elevado con fases lag aumentadas entre 45 y 140 minutos, respectivamente. El mutante de menor *fitness* (sobreescribió *acrF* (cambio de expresión 1,99±0,81) y el regulador global *marA* (cambio de expresión 4,31±0,71). El mutante **TRI^R** (*Ec_BKC/BKC2*) exhibió una menor expresión de *acrB*, *acrF*, *marA* y *soxS* (cambios de expresión de 0,26±0,17; 0,18±0,15; 0,32±0,18 y 0,21±0,18, respectivamente) (véase Tabla 26 y Figura 30). El valor de coste de otros mutantes **TRI^R/CHX^S** fue más bajo (≈1 %) diferenciándose de los mutantes de similar fenotipo por la mejor capacidad de estos para metabolizar determinadas fuentes de carbono (Tabla 29).

El coste de los mutantes de *Kp* analizados fue también muy variable (0-66%). El mutante **TRI^RBKC^R** (*Kp_Cip/BKC2*) que mostró marcada reducción de sensibilidad antimicrobiana tuvo el coste más elevado (66%) y la fase lag aumentada en 360 minutos. Junto con otros dos **TRI^RBKC^RCHX^R** (*Kp_Amp/Tri2*, *Kp_NaOCl/Cip*) con coste biológico de 11 y 15%, respectivamente, metabolizaron menos eficientemente que la cepa salvaje un elevado número de ácidos carboxílicos, aminoácidos, azúcares y aminoazúcares (del peptidoglicano). Los mutantes con costes biológicos más bajos (0 a 4%) (**TRI^RBKC^R**, **TRI^SBKC^S** y **TRI^SCHX^S** *Kp_Tri/Tri2*, *Kp_SE/CHX2* y *Kp_Cip/CHX2*) mostraron tanto sobreexpresión como represión de *acrB* y *acrF* y sobreexpresión de *marA* (n=1, cambio de expresión 2,21±0,18), aunque aquel con mayor coste biológico **TRI^RBKC^R** (*Kp_Cip/BKC2*) presentó el regulador transcripcional *ramA* más sobreexpresado (cambio de expresión 45,01±40,81) (Figura 30). Los mutantes **TRI^S**, **TRI^SCHX^S** y **TRI^SBKC^S** estudiados no exhibieron coste cuantificable en las condiciones experimentales utilizadas.

El coste de mutantes de *Sal* con distintos fenotipos a biocidas fue también variable (0-52%). Los mutantes **TRI^RBKC^RCHX^R** (*Sal_SE/Tri1*, *Sal_SE/CHX2*), **BKC^R** (*Sal_Tri/BKC3*) y **TRI^{HS}** (*Sal_CHX/Amp*) mostraron un menor *fitness* (CB de 18, 52, 22 y 44%, respectivamente) (Figura 31). No obstante, otros (**BKC^R**, **TRI^{HS}CHX^S**) crecieron mejor que la cepa salvaje. Uno de los mutantes **TRI^RBKC^RCHX^R** (*Sal_SE/CHX2*) con una marcada reducción de sensibilidad a CIP, ERI y TET y aumento de sensibilidad a CAZ tuvo un coste elevado con una ampliación de la fase lag de 350 min y presentó el regulador *ramA* sobreexpresado (cambio de expresión 23,64±8,50). Sin embargo, el mutante **TRI^{HS}**

también con elevado coste y aumentada reducción de sensibilidad antimicrobiana no presentó cambios en la expresión de *ramA*. Los mutantes cuya preexposición se hizo con CIP crecieron ligeramente mejor que la cepa salvaje. La disminución de sensibilidad a diferentes antibióticos (AMP, CIP, ERI, CLO y TET) se asoció con un elevado coste en los mutantes de *Sal*.

La sobreexpresión de *marA/ramA* en ausencia de sobreexpresión de la bomba AcrAB fue detectada en las especies estudiadas acompañada de elevado coste biológico y marcada reducción de sensibilidad a otros antimicrobianos (mutantes **TRI^RBKC^R** y **TRI^RBKC^RCHX^R** de las tres especies analizadas con la excepción de 1 mutante *Ec* donde la expresión de *acrF* estuvo ligeramente aumentada).

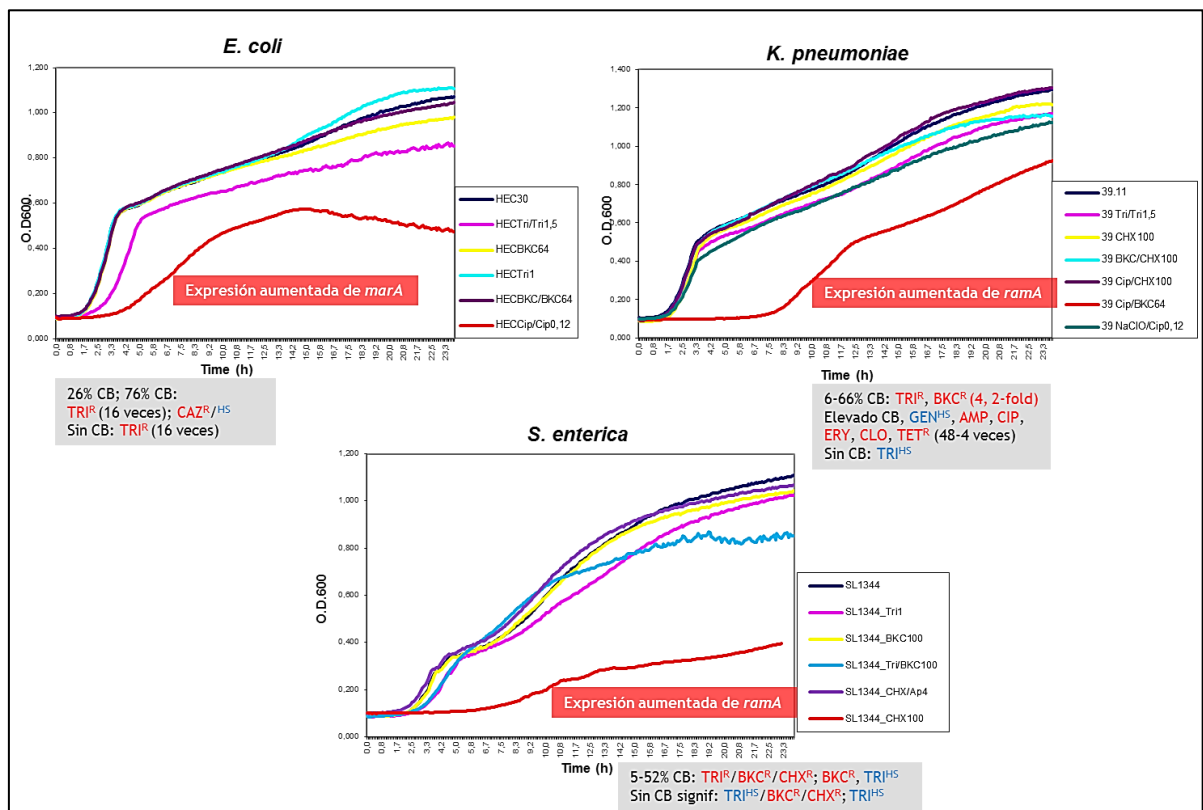


Figura 29. Curvas de crecimiento de diferentes mutantes a biocidas/antibióticos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enterica* obtenidas en medio LB con agitación, a 37°C.

CB: Coste Biológico

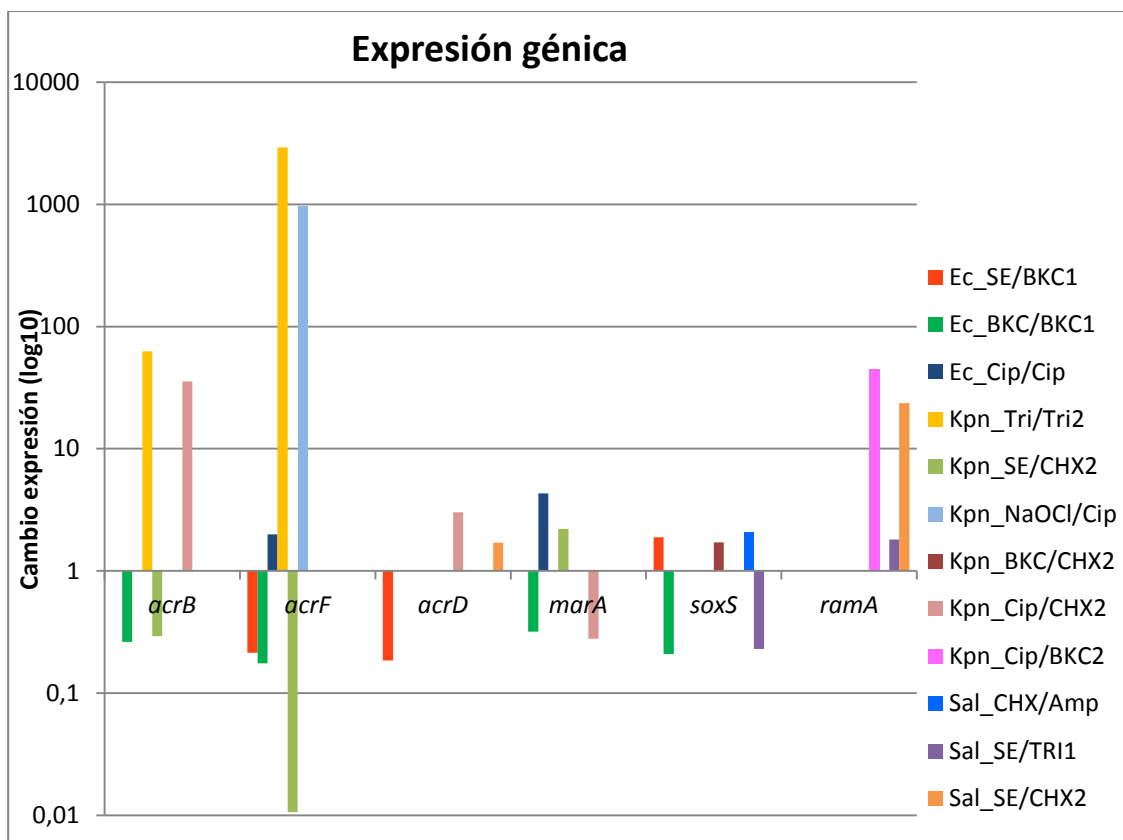


Figura 30. Expresión génica diferencial de los diferentes componentes de bombas AcrAB y reguladores globales para mutantes a biocidas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. enterica*.

4.3.5. Diversidad de *fabI*

Los principales cambios encontrados en la proteína FabI para mutantes con fenotipos bien de reducida sensibilidad (3 TRI^RCHX^S en *E. coli*, TRI^RBKC^RCHX^R y TRI^RCHX^R en *K. pneumoniae*, y TRI^RBKC^RCHX^R en *Salmonella*) o aumentada sensibilidad a TRI (TRI^SBKC^S de *Kp* y TRI^SBKC^RCHX^R y TRI^SCHX^S de *Sal*) se muestran en la tabla 31.

Dos de los tres mutantes TRI^R de *Ec* (CMI_{TRI} de 4, 1 y 0,12 mg/L) analizados presentaron cambios en el sitio activo de la proteína FabI, Gly93Val (CMI_{TRI}=4 mg/L) previamente asociado a tolerancia a TRI (47,97) y Leu94Phe (CMI_{TRI}=1 mg/L), e idéntico a la secuencia de FabI de la cepa *E. coli* K12 pero no asociado anteriormente a tolerancia a TRI. El mutante con CMI incrementada en una dilución no presentó cambios en la secuencia de *fabI*.

Ninguno de los mutantes de *Kp* analizados, bien con CMI_{TRI} aumentada (2 mg/L) o CMI_{TRI} disminuida (0,12 mg/L) presentó cambios nucleotídicos o aminoacídicos en FabI, respecto a la cepa salvaje (CMI_{TRI} de 0,5 mg/L).

El mutante de *Sal* con el valor de CMI_{TRI} más elevado (2 mg/L) presentó un cambio aminoacídico en la posición 93 diferente al detectado en *Ec*, Gly93Ser, el cual también ha sido previamente descrito en *Sal* tolerante a TRI (47). Entre los mutantes con valores de CMI_{TRI} ligeramente aumentada (0,12 mg/L) o disminuida (0,015, 0,03 mg/L) solo *Sal_Cip/CHX1* con CMI 0,03 mg/L y una marcada alteración de sensibilidad a antibióticos fue el que presentó mayor número de cambios nucleotídicos (n=98) que se tradujeron en 7 cambios de aminoácidos en diferentes posiciones, ninguno de ellos descrito previamente.

Tabla 31. Cambios aminoacídicos en FabI para mutantes de *E. coli* y *Salmonella* con sensibilidad alterada a triclosan respecto a sus correspondientes cepas parentales.

Cepa	CMI TRI	Cambios FabI respecto a cepa salvaje
<i>Ec</i> salvaje	0,06	-
<i>Ec_Tri/Tri2</i>	4	1 nt: Gly93→Val ^a
<i>Ec_SE/Tri1</i>	1	1 nt: Leu94→Phe
<i>Ec_Tri/BKC1</i>	0,12	0
<i>Sal</i> SL1344	0,06	-
<i>Sal_SE/Tri1</i>	2	1 nt: Gly93→Ser ^a
<i>Sal_SE/CHX2</i>	0,12	0
<i>Sal_Tri/Amp</i>	0,015	0
<i>Sal_Cip/CHX1</i>	0,03	98 nt; 7 aa: Ser58→Asp, Pro62→Gln, Ala69→ Thr, Ala73→Thr, Asn80→Lys, Val115→ Ile, Thr133→Ser

Secuencias proteicas y otra información retirada de la base de datos Uniprot (http://www.uniprot.org/uniprot/P0AEK4#ref1 y http://www.uniprot.org/uniprot/P16657#ref1).

4.3.6. Transcriptómica en aislados con sensibilidad disminuida a biocidas

4.3.6.1. Alteraciones comunes en el transcriptoma de mutantes resistentes a biocidas seleccionados de *S. enterica* SL1344

El análisis del transcriptoma de 11 mutantes de *Sal* con diferentes fenotipos a biocidas y antibióticos (3 TRI^RBKC^RCHX^R, 1 BKC^R, 3 TRI^{HS}BKC^RCHX^R, 1 TRI^{HS}CHX^{HS} y 1 TRI^{HS}) reveló la presencia de 59 genes con expresión alterada (hasta en 7 mutantes) en comparación con la cepa parental (Tabla 32 y Tabla 33) y que fueron asociados con la presencia de *bombas de eflujo*, *proteínas ribosomales*, *mecanismos de respuesta al estrés*, *factores implicados en virulencia*, *metabolismo* y componentes de *membrana*. Las alteraciones de sobreexpresión génica variaron de 2,02 a 7,40 veces mientras que la disminución de la expresión varió entre 0,04 a 0,47 veces (Tabla 33). Los dos mutantes con los valores más elevados de CB no exhibieron alteraciones relevantes en sus transcriptomas.

Se identificaron alteraciones comunes en mutantes del mismo o diferente fenotipo a biocidas. A continuación se describen los patrones de expresión más sobresalientes observados en algunos mutantes.

El mutante TRI^RBKC^RCHX^R (*Sal*_CHX/BKC3) fue el que presentó mayor número de genes con expresión alterada (bien aumentada, bien disminuida).

Dos mutantes, TRI^RBKC^RCHX^R (*Sal*_BKC/AMP) y TRI^{HS}BKC^RCHX^R (*Sal*_BKC/CHX2), presentaron un aumento de expresión de los genes codificantes de bombas de eflujo *AcrA* y *SugE2*, ambos previamente asociados a la resistencia a compuestos de amonio cuaternario (48,108,189,373-375). También los mutantes TRI^RBKC^RCHX^R (*Sal*_SE/CHX2), BKC^R (*Sal*_Cip/Tri1) y TRI^{HS}CHX^{HS} (*Sal*_Cip/CHX1) mostraron aumento de expresión del gen *ΔqacE*, clásicamente involucrado en la resistencia atenuada a compuestos de amonio cuaternario (74). Sin embargo, otros mutantes con sensibilidad disminuida a BKC no exhibieron una expresión alterada a genes asociados a mecanismos de resistencia conocidos.

Los mutantes TRI^RBKC^RCHX^R (*Sal*_CHX/BKC3 y *Sal*_SE/Tri1) y algunos BKC^R (*Sal*_TRI/BKC3) exhibieron un aumento de la expresión de *genes codificantes de proteínas ribosomales* (subunidades 50S y 30S, n= 25, 20 siendo expresados en los 3 mutantes) y otros elementos relacionados con la traducción (n=4).

Los mutantes TRI^RBKC^RCHX^R (*Sal*_CHX/BKC3), BKC^R (*Sal*_TRI/BKC3) y TRI^{HS}CHX^{HS} (*Sal*_CIP/CHX1) también sobreexpresaron genes relacionados con *respuesta al estrés general* (e.g. la proteína de *respuesta al choque frío* CspA y la *lisina-d Descarboxilasa*,

habitualmente inducida por condiciones ambientales de descenso de pH, exceso de lisina y anaerobiosis, y que afecta negativamente la adherencia y colonización intestinal bacteriana) (376,377). La expresión de dos *proteínas relacionadas con zinc* (YecM y la reguladora de la absorción del oligoelemento) estuvo aumentada en los mutantes $\text{TRI}^{\text{HS}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ *Sal_BKC/CHX2* y $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ *Sal_NE/CHX2*, lo cual podría indicar que la exposición a CHX interfiere con las rutas metabólicas del zinc. El sistema de absorción de zinc se relacionó además con virulencia por diferentes rutas, incluyendo la represión del sistema de secreción tipo III vía *soxS* (135,378). La enzima *piruvato quinasa*, con un papel central en la glicólisis, o actuando como donadora de fosfato en anaerobiosis para los nucleósidos difosfato estuvo sobreexpresada (2,82-4,40) en los mutantes $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ (*Sal_CHX/BKC3*, *Sal_NE/Tri*) y BKC^{R} (*Sal_Tri/BKC3*), los cuales presentaron un considerable incremento de la expresión de proteínas ribosomales. Este último mutante *Sal_Tri/BKC3* presentó además el *regulador de virulencia PhoP* aumentado.

La sensibilidad alterada a biocidas se asoció con un menor número de genes con expresión atenuada que aquellos sobreexpresados (11 versus 58). Los genes con expresión disminuida probablemente no forman parte de la respuesta adaptativa a los biocidas, siendo que en su mayoría reflejen costes biológicos asociados a dicha adaptación. Podría ser el caso del *sistema de secreción tipo III* (SST3) (cambios de expresión de 0,04-0,14 veces), expresado en nivel más bajo que en la cepa salvaje en los 3 mutantes, que además presentaron un aumento de la expresión de genes codificantes de proteínas ribosomales ($\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ y BKC^{R}). La represión del SST3 podría estar relacionada con una disminución de la virulencia, como ha sido previamente observado en cepas resistentes a antibióticos (149,194). Otras *proteínas relacionadas con el estrés/virulencia* como el *factor* σ^{54} e *YobF* fueron expresadas en menores niveles en dos mutantes seleccionados con CHX y BKC, $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ *Sal_CHX/BKC3* y $\text{TRI}^{\text{HS}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ *Sal_BKC/CHX2*. La proteína de modulación σ^{54} codificada por el gen *rpoN* es un factor inducible por el estrés que regula la transcripción de genes relacionados con el transporte de proteínas y la biosíntesis de intermediarios metabólicos de exopolisacáridos, lípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas, flagelos y peptidoglicano. Esta proteína ejerce un control central sobre procesos de interacción física del microorganismo con el medioambiente, como son la colonización de un hospedador o la formación de biopelículas (379). La proteína *YobF*, identificada en *E. coli* como postranscripcional es inducida por choque al calor o a ácidos, o estrés sobre la membrana (380,381). En los mismos mutantes también la *porina de membrana OmpC* y una *lipoproteína de membrana* se encontraron subexpresadas.

Otros genes subexpresados en mutantes $\text{TRI}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}\text{CHX}^{\text{R}}$ (*Sal*_{CHX/BKC3} y *Sal*_{NE/Tri1}) con proteínas ribosomales aumentadas fueron sobre todo genes codificantes de proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos, tales como: treonina deshidratasa, transportador treonina/serina TdcD, glicina descarboxilasa, cofactor del radical glicil, además de sintetasa fosfoenolpiruvato.

4.3.6.2. Análisis transcriptómico de aislados naturales de *Salmonella*

La expresión de genes de resistencia a biocidas y/o antibióticos y genes implicados en el metabolismo fue analizada en aislados naturales de *Salmonella* con sensibilidad reducida a TRI (n=3; CMI de 1-2 mg/L), CHX (n=1; CMI=16 mg/L, simultáneamente menos sensible a BKC) y BKC (n=7; CMI=128 mg/L), y con sensibilidad normal a TRI (CMI de 0,06-0,12 mg/L), CHX (CMI de 2-8 mg/L) y BKC (CMI 32-64 mg/L). Al igual que para los mutantes, la sensibilidad reducida a biocidas entre los aislados naturales de *Sal* no se pudo explicar por el aumento de la expresión de bombas de eflujo más habituales (Qac, SugE, AcrAB-TolC). Los aislados no presentaron determinantes Qac, frecuentemente responsables de la resistencia a cloruro de benzalconio. Sin embargo, un aislado (sensibilidad a BKC normal) presentó expresión aumentada de **SugE2** (de resistencia a compuestos de amonio cuaternario), también encontrado en los mutantes seleccionados *in vitro*. La cepa con CMB_{TRI} más elevada (>512 mg/L) mostró aumento de la expresión del transportador ABC **YdeY** (cambio de 2,77 veces) encontrado en el genoma de diferentes aislados de *Salmonella enterica* para el cual no se ha descrito aún un papel en la resistencia a biocidas. La expresión disminuida de *acrE* (0,42-0,47 veces) fue identificada en 3 clones diferentes con sensibilidad normal a TRI, CHX y BKC.

Los resultados del array identificaron mayoritariamente la baja expresión de enzimas inactivantes de aminoglicósidos *strA*, *strB* (n=14: 3 TRI^{R} , 5 BKC^{R} , 1 $\text{CHX}^{\text{R}}\text{BKC}^{\text{R}}$ y 5 $\text{TRI}^{\text{S}}\text{CHX}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$) y del gen de resistencia a tetraciclina *tetA* codificante de una bomba de eflujo (n=1: BKC^{R}), además se detectó un aumento de expresión de genes codificantes de TEM-1 (n=2: 1 BKC^{R} , 1 $\text{TRI}^{\text{S}}\text{CHX}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$), de resistencia a arsénico (n=2: $\text{TRI}^{\text{S}}\text{CHX}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$) y polimixina B, *pmrD* (n=3: 1 TRI^{R} , 1 BKC^{R} , 1 $\text{TRI}^{\text{S}}\text{CHX}^{\text{S}}\text{BKC}^{\text{S}}$).

Un total de 43 genes estuvieron sobreexpresados (2,05 a 13,72) (Tabla 32 y Tabla 34). Se observó un aumento de la expresión de genes codificantes de diferentes funciones celulares, algunos de los cuales estaban relacionados con los descritos anteriormente en los mutantes, como son: las **proteínas ribosomales** (n=5: 2 TRI^{R} , 2

BKCR y 1 TRI^SCHX^SBKC^S), la proteína de *respuesta al choque frío* (CpsE) (n=7: 2 TRI^R, 1 CHX^RBKCR, 2 BKCR y 2 TRI^SCHX^SBKC^S), los componentes del *sistema PTS* y otros *genes metabólicos* (e.g. piruvato y acetato quinasa, biotina carboxilasa, reductasas y hidratasas) (n=10: 2 TRI^R, 3 BKCR, 1 CHX^RBKCR y 4 TRI^SCHX^SBKC^S) y otras como *proteínas de virulencia* como el *factor estimulante de macrófagos* (n=4: 1 TRI^R, 2 BKCR y 1 TRI^SCHX^SBKC^S), la *proteína reguladora de invasión* (n=5: 1 TRI^R, 2 BKCR y 2 TRI^SCHX^SBKC^S), la *proteína asociada al flagelo* (n=4: 1 BKCR y 3 TRI^SCHX^SBKC^S), el *factor de virulencia codificado por bacteriófago pagK* (n=1: 1 BKCR) y la *porina* de membrana OmpE (n=5: 2 BKCR, 1 CHX^RBKCR y 2 TRI^SCHX^SBKC^S) (Tabla 32). Los aislados de fenotipo TRI^R y BKCR fueron los que, mayoritariamente, presentaron las características mencionadas.

Aunque el número de proteínas ribosomales con expresión aumentada fue menor en los aislados naturales que en los mutantes de *Sal* (25 versus 8), todas excepto una proteína ribosomal (L21) coincidieron con las sobreexpresadas en los mutantes. También, *sugE*, el gen codificante de la sintasa cobalto-precorrina-6-A, de la piruvato quinasa y de la proteína de choque al frío estuvieron sobreexpresados en ambos casos. En el caso de los aislados naturales se observó sobreexpresión de un mayor número de genes relacionados con el metabolismo (16 versus 8) (Tabla 32).

Diferentes variantes de un mismo clon (e.g. perfiles de campo pulsado A, A3.1 y A3.2 o E y E5) presentaron diferente fenotipo de sensibilidad a los biocidas estudiados, y también distintos perfiles de genes sobreexpresados (Tabla 34). Entre los aislados TRI^R, él que tuvo una mayor diferencia entre el valor de CMI y CMB (>512 mg/L), no presentó tantos genes sobreexpresados como los demás. No obstante, los mutantes que presentaron un cambio más significativo de CMI a CMB para CHX (n=1, 16 mg/L) y BKC (n=2, >2 mg/L) se asociaron a gran número de genes sobreexpresados.

En resumen, la resistencia bacteriana acentuada a biocidas podría determinar aumentos en la expresión del sistema PTS, de sistemas de respuesta al estrés/adaptación, virulencia/patogenicidad y/o de la vía de resistencia a polimixina.

Tabla 32. Categorías de genes con expresión diferencial para los aislados de *Salmonella* con sensibilidad alterada a biocidas (mutantes y cepas naturales).

	Mutantes SL1344 a biocidas		Aislados naturales con reducida sensibilidad a biocidas
	Expresión aumentada (n=48)	Expresión disminuida (n=11)	Expresión aumentada (n=43)
Resistencia	AcrA SugE*, $\Delta qacE$	-	SugE* Proteína de resistencia a polimixina B
Membrana celular	-	OmpC, lipoproteína	Transportador ABC YdeY, OmpE
Traducción	Prot. ribosomales 50L y 30S*, ARN helicasa, factor IF-3	-	Prot. ribosomales 50L y 30S*
Estrés/adaptación	Proteína del choque al frío* Proteínas del metabolismo del zinc (YecM y transportadora)	YobF, σ^{54}	Proteína de choque al frío*
Metabolismo	Lisina descarboxilasa Piruvato quinasa	Treonina desidratasa, transportador Thr/Ser TdcD, glicina descarboxilasa, cofactor del radical glicil, sintetasa fosfoenolpiruvato	Sistema PTS* y otros genes (reductasas, hidratasas)
Virulencia	Regulador PhoP	SST3	Factor estimulante de macrófagos Proteína reguladora de invasión Proteína asociada al flagelo Factor virulencia PagK

*Genes sobreexpresados en mutantes y aislados naturales.

Tabla 33. Perfiles de expresión génica de mutantes de *Salmonella*.

		Diferencias de expresión génica										
		SE/ CHX2	CHX/ BKC3	SE/ Tri1	BKC/ Amp	Cip/ Tri	Tri/ BKC3	SE/ BKC3	BKC/ CHX2	Tri/ Amp	Cip/ CHX1	CHX/ Amp
		TRI ^R /BKC ^R /CHX ^R			BKC ^R			TRI ^{HS} /BKC ^R /CHX ^R			TRI ^{HS} / CHX ^{HS}	TRI ^{HS}
Gen/ id.locus	Nombre Uniprot	-	ERY ^R	ERY ^R / CLO ^R	-	ERY ^R / CLO ^R	ERY ^R /CLO ^R /TET ^R	ERY ^R / CLO ^R	-	ERY ^R	-	Amp ^R /CAZ ^R /ERY ^R /CLO ^R /TET ^R
SL1344_3615	Cold shock protein		3,34					5,70			2,14	
SL1344_2521	Lysine decarboxylase		0,23		3,80						3,49	3,50
SL1344_1131	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase		2,23	2,11								
SL1344_1312	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)		3,53	2,82				4,40				
SL1344_0917	Cytidylate/Cytidine kinase (CK)		2,67					2,32				
SL1344_1225	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A		3,93					5,13				
SL1344_2008	Putative cobalt-precorrin-6A synthase [deacetylating] (EC 2.1.1.-)				2,80			3,05			2,84	
p165897_016	Putative conjugal transfer protein TraR	2,49		2,61	2,10			2,15		2,13	2,14	2,24
SL1344_1843	Putative uncharacterized protein yecM	2,09							2,19			
SL1344_4177	Zinc uptake regulation protein	2,02							2,35			
SL1344_1190	Hypothetical lipoprotein		6,45	2,67				7,40				
SL1344_1377	Outer membrane lipoprotein SlyB		3,25						0,42			
p3521_p011	Pill (Putative uncharacterized protein pill)							2,13	2,65			2,24
MAR073	F pilus assembly protein TraK (IncF plasmid)	2,69							2,09			2,07
SL1344_3253	ATP-dependent RNA helicase (Dead-box protein)		3,27	4,37								2,19
SL1344_4325	Primosomal replication protein n		3,28	3,36								
SL1344_1267	Threonine--tRNA ligase synthetase)		2,22					2,59				
SL1344_1268	Translation initiation factor IF-3		4,15	2,36				5,48				
SL1344_3275	50S ribosomal protein L27		4,69	3,97				3,68				

SL1344_3317	50S ribosomal protein L13	3,71	3,55	2,25
SL1344_3396	50S ribosomal protein L24	3,13	3,51	
SL1344_3391	50S ribosomal protein L18	3,79	4,59	
SL1344_3381	50S ribosomal protein L17	3,60	3,09	
SL1344_3405	50S ribosomal protein L23	3,50	4,72	2,79
SL1344_3395	50S ribosomal protein L5	4,23	3,91	
SL1344_2201	50S ribosomal protein L25	2,46	2,43	
SL1344_3406	50S ribosomal protein L4	3,26	4,66	
SL1344_3407	50S ribosomal protein L3	3,92	5,89	
SL1344_3806	50S ribosomal protein L34	4,77		2,76
SL1344_3693	50S ribosomal protein L33	3,47		2,72
SL1344_1269	50S ribosomal protein L35	5,13		4,38
SL1344_3694	50S ribosomal protein L28	4,10		2,35
SL1344_1270	50S ribosomal protein L20	3,33		3,04
SL1344_3385	30S ribosomal protein S13	3,70	3,45	
SL1344_3408	30S ribosomal protein S10	4,42	4,26	3,00
SL1344_3393	30S ribosomal protein S8	3,82	3,73	
SL1344_0044	30S ribosomal protein S20	4,47	2,72	2,77
SL1344_0918	30S ribosomal protein S1	2,82	3,15	
SL1344_3384	30S ribosomal protein S11	4,10	4,06	
SL1344_3414	30S ribosomal protein S7	4,60	4,32	
SL1344_3316	30S ribosomal protein S9	3,35	2,98	
SL1344_3390	30S ribosomal protein S5	2,94	3,24	
SL1344_4326	30S ribosomal protein S18	3,80	5,18	
SNSL254_pSN254_0150	Quaternary ammonium compound-resistance protein QacEdelta1	2,46		2,63
SL1344_3955	GTP-binding protein	2,16	2,81	
pEFER_0031	Putative resolvase	2,70		2,14

SL1344_1568	Possible methyltransferase		3,26		2,73	
HCM2.0069c	Putative uncharacterized protein HCM2.0069c	2,35				2,33
	Acriflavin resistance protein A			2,38		
	Quaternary ammonium compound-resistance protein SugE2					2,32
	Quaternary ammonium compound-resistance protein QacEdelta1	2,46		2,63		2,86
SL1344_3216	Catabolic threonine dehydratase		0,12	0,07		
SL1344_3029	Glycine dehydrogenase (Glycine cleavage system P-protein)		0,42	0,46		
SL1344_1283	Phosphoenolpyruvate synthase		0,38	0,34		
SL1344_3215	Threonine/serine transporter TdcC (H+)/threonine-serine symporter)		0,13	0,12		
SL1344_2610	Autonomous glycy radical cofactor		0,21			0,35
SL1344_2853	Type III secretion system apparatus		0,04	0,14	0,05	
SL1344_2237	Outer membrane protein C		0,21		0,13	0,33
SL1344_1767	Putative uncharacterized protein yobF		0,36			0,33
SL1344_2624	Hypothetical sigma (54) modulation protein		0,24			0,43
SL1344_0877	Hypothetical membrane protein		0,47	0,46		

p165897_016, MAR073 (*traK*) se localizaron en el plásmido pSL1344 (homología del 84% en nt con *traR* de pSLT_1344 y del 80% en nt con *traK* de pSLT_1344 GenBank HE654724, respectivamente)

Tabla 34. Perfiles de expresión génica de aislados naturales de *Salmonella*.

Fenotipo a biocidas	TRI ^R			CHX ^R BKC ^R	BKC ^R						TRI ^R CHX ^R BKC ^R					
CMI (TRI;CHX;BKC)	1;8;32	1;4;32	2;4;64	0,06;16;128	0,03;2;128	0,03;2;128	0,12;8,128	0,12;8,128	0,12;8,128	0,12;4;128	0,12;8;64	0,12;4;64	0,12;8;64	0,12;4;32	0,12;4;32	0,06;2;32
CMB (TRI;CHX;BKC)	>512;32;64	32;64;32	32;64;>128	32;32;128	32;4;128	32;4;>128	64;8;>128	64;8;128	64;8;128	32;8;128	64;8;64	32;8;64	64;8;128	32;4;32	32;16;32	32;4;64
Clone	A3.1	T	N-like	P4	E5	I	B	C	E	Deg.	J	Deg	L	Q	A	A3.2
Nombre uniprot	QBR_638	QBR_545	QBR_854	QBR_168	QBR_076	QBR_078	QBR_070	QBR_071	QBR_073	QBR_161	QBR_104	QBR_105	QBR_163	QBR_194	QBR_195	QBR_209
PTS system, mannose-specific IIAB component		4,87	3,82	4,93			4,89		3,00	3,43	3,35		2,61			4,19
treB (trehalose transporter)		5,58	3,02	4,52			4,77		2,91	4,25	3,83	3,66	3,43			3,20
Trehalose-6-phosphate hydrolase		2,72	2,91	4,03		3,58	3,34		2,77	2,66	2,57	3,21	2,52			2,53
Phosphotransferase enzyme II, C component			2,89	3,87							2,85	2,80				
Pyruvate kinase		4,96	3,85	3,20			3,42				2,66	3,43		2,90		2,68
Pimelyl-[acyl-carrier protein] methyl ester esterase (Biotin synthesis protein BioH) (Carboxylesterase BioH)			2,84					3,45	2,50					2,21		
Acetate kinase		4,52		3,01							2,46	2,14	2,08	2,28		
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A		8,10	3,52	5,01							4,30	4,24	4,13			
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase		3,89		4,41							4,23	2,82				
Fumarate reductase subunit C		3,49	2,37	3,52				3,00			2,81		2,99			2,20
Fumarate reductase, iron-sulfur protein		3,05		2,85									2,74			
Fumarate hydratase class I				3,58							2,65		2,23			
Biotin carboxylase		3,19	2,45	3,03							3,09	2,09				
Ferritin-like protein	2,96													5,68	13,72	
Putative cobalt-precorrin-6A synthase				3,56			3,45	3,58	2,76		3,53					
Probable hydrogenase-2		4,37		3,51							2,38		3,36	2,27		
cytochrome b subunit																
Putative conjugal transfer protein TraR	2,18		2,41				2,05				2,00		2,26	2,11		2,33

Plasmid partitioning protein ParF	2,49	2,63	2,86	2,31	3,37	2,96	2,80			2,29	2,60
Flagellar hook-associated protein 3				2,91				2,40	2,34		2,09
Cold shock-like protein cspE	4,21	2,87	3,74	3,07			3,05	2,77		2,79	
Macrophage stimulating factor homolog	2,11					2,14	2,32	2,33			
Invasion protein regulator	3,24			2,48			2,24		2,42	2,45	
50S ribosomal protein L28	3,92	2,83	3,29	3,15			2,16	2,68			
50S ribosomal protein L27	3,44	3,02	3,27	3,48			2,93	3,19			2,20
50S ribosomal protein L5	4,34	4,32	4,12				3,62	2,64			
50S ribosomal protein L17	4,24	2,67	2,88				2,15	2,27			
50S ribosomal protein L34	4,41	3,59	3,95				2,41	2,17			
50S ribosomal protein L21	2,64		2,58				2,32			2,29	
30S ribosomal protein S10	3,89	3,93	4,78				2,87	2,60			
30S ribosomal protein S13	4,45	2,89	2,76				3,31	2,31		2,37	
Outer membrane protease E			2,77		5,76		3,59			4,09	3,78
Hypothetical membrane protein	2,50	2,40					2,21	2,02	2,72	2,71	2,06
Putative positive regulator	2,91		2,76		3,06		3,79		4,30	3,14	2,59
TrwG	2,53			4,86				2,41			3,16
W0064								2,13	2,12		
YdjA protein							2,77		3,33	2,80	
Uncharacterized protein yuaZ						3,08	3,40	2,86			3,36
Putative uncharacterized protein MAK1.219c			3,49			2,71	2,12	2,25			
Uncharacterized protein yuaZ		2,62				4,27	2,76	3,12	2,52		3,37
Putative uncharacterized protein			2,79					2,34	2,36	2,77	2,57
Putative uncharacterized protein			2,37		2,06				2,11	2,23	
Polymyxin B resistance protein	2,50			3,79							2,97

ydeY (ABC transporter)	2,77			
Quaternary ammonium compound-resistance protein SugE2				2,04
AcrE		0.42	0.44	0.48

4.3.7. Discusión

La diversidad de fenotipos y genotipos que confieren resistencia a biocidas (TRI, CHX, BKC y NaOCl) y antibióticos (CIP, AMP y CAZ) tras exposición *in vitro* a diferentes compuestos ampliamente usados en el medio hospitalario y veterinario, ponen de manifiesto el riesgo de desarrollo de resistencia cruzada a estos dos grupos de agentes antimicrobianos en diferentes enterobacterias.

La obtención de fenotipos tanto de sensibilidad aumentada como disminuida a biocidas contrasta con estudios anteriores que describen mayoritariamente mutantes a biocidas con sensibilidad disminuida (35,103,184,187,382) obtenidos tras exposiciones sucesivas a concentraciones crecientes (36,53,180,187,197). Estos resultados podrían reflejar la existencia previa de mutantes (no seleccionados) y/o la aparición de mecanismos compensatorios tras un periodo corto de adaptabilidad a la exposición a estos compuestos, como se ha descrito en estudios puntuales (36).

De forma similar a otros trabajos, la generación de mutantes tolerantes a TRI y/o a BKC fue más frecuente que la de tolerantes a CHX en las 3 especies analizadas (36,95). En estas tres especies se observaron los fenotipos TRI^RBKC^R, y otros como TRI^RCHX^S, TRI^R, BKC^R, TRI^{HS}BKC^RCHX^R y TRI^{HS}BKC^{HS} que fueron especie-específicos al igual que se ha documentado para la resistencia cruzada a antibióticos, que parece ser una respuesta específica de la cepa (34,187). El fenotipo TRI^RCHX^S obtenido para *Ec* fue así mismo observado en mutantes de *S. enterica* seleccionados con TRI (383). El fenotipo BKC^RCHX^R, atribuido a bombas de eflujo como CepA y AcrAB, es también habitualmente encontrado (187,189,366,384) aunque aquí se haya asociado siempre con alteración de sensibilidad a TRI.

El análisis de los perfiles fenotípicos por Biolog y arrays de expresión reflejó cambios asociados con la presencia de *bombas de eflujo*, *proteínas ribosomales*, mecanismos de *respuesta al estrés*, factores implicados en *virulencia*, *metabolismo*, permeabilidad de la membrana y síntesis de la pared celular. La mayor sensibilidad de los mutantes obtenidos a moléculas catiónicas como aminoglicósidos, colistina, polimixina o poli-L-lisina, las cuales desestabilizan la membrana causando la reorganización del LPS (lipopolisacárido) y aumentando su permeabilidad (140), sugiere que ésta estaría afectada de forma similar a como se ha descrito en *S. marcencens* y *Pseudomonas* (103). El aumento de sensibilidad a aminoglicósidos de mutantes TRI^R o BKC^R ha sido registrado para *Ec*, *Sal* o *P. aeruginosa* apuntando a un posible papel del LPS de la membrana externa en la protección contra compuestos hidrófobos y policatiónicos, o a un aumento de porinas y la posibilidad, a su vez, que los biocidas sean

responsables de esta alteración (140,173,383,385). Por el contrario, las especies grampositivas como *L. monocytogenes* o *S. aureus*, tras la exposición a biocidas (50,184,386) mostraron menor sensibilidad a aminoglicósidos posiblemente por las diferencias en la composición de la membrana de los microorganismos grampositivos y gramnegativos. La resistencia a otros compuestos con diferente actividad sobre la membrana (β -lactámicos incluyendo cefalosporinas, guanidinas como dodina, alexidina y QACs) posiblemente sea debida a que no interfieren directamente con la permeabilidad. Los resultados indican que la implicación de la bomba AcrAB no fue relevante en todos los aislados, aunque no se puede descartar la similitud de perfiles de resistencia a substratos cuya expulsión se atribuye a TolC como cationes tóxicos, agentes oxidantes y QACs (387), teniendo en cuenta que TolC está al servicio de otras bombas de eflujo (43). Sin embargo, los mutantes de *Kp* TRI^RBKC^R fueron específicamente más resistentes que los demás a estos agentes, sugiriendo una posible intervención de alguna bomba de eflujo además de AcrAB-TolC. Por ejemplo, la expresión del transportador de multiresistencia Bcr incrementa la tolerancia a antibióticos antifolato, cuya sensibilidad estuvo disminuida específicamente para mutantes de *Kp*; y el transportador MdtM es responsable de la expulsión de tóxicos, entre ellos la puromicina, cuya resistencia fue detectada en los mismos mutantes (388). Para *Ec* y *Sal* se observó una particular sensibilidad a los compuestos referidos, lo que supondría una menor implicación de bombas de expulsión con cierta especificidad.

La resistencia cruzada a CIP y CLO fue muy frecuente, siendo elevada en los fenotipos TRI^RBKC^RCHX^R y TRI^RBKC^R de *Kp* (cambios de hasta 16 veces y >128 veces, respectivamente). En mutantes de *Sal* la resistencia a CIP de alto nivel (normalmente debida a mutaciones en el gen *gyrA* entre otras rutas) se asoció a la de CLO, TET, β -lactámicos y biocidas (115). El desarrollo *in vitro* de resistencia a biocidas ha sido estudiado mayoritariamente en *S. enterica*, y se centró en el análisis de los cambios de sensibilidad a antibióticos y de expresión de componentes de bombas de eflujo (35,36,169,180,382). Al contrario de lo que pasa en la resistencia a antibióticos, la resistencia a biocidas es normalmente multifactorial debida a mecanismos intrínsecos y menos específicos. Además, la implicación de reguladores globales en la tolerancia a biocidas hace difícil establecer relaciones causa-efecto. Dicha resistencia se relaciona frecuentemente con cambios mutacionales en genes estructurales o reguladores que afectan a la expresión de ciertas bombas de eflujo constitutivas (179). La sobreexpresión de la bomba AcrAB-TolC confiere resistencia de bajo nivel a biocidas, pero otras bombas de eflujo (MdtM, SugE, Qac, ErmD y ErmE, YdhE, OqxAB, CepA asociadas a resistencia a

compuestos de amonio cuaternario) y porinas podrían, además, tener un papel sobre la sensibilidad a biocidas (104,113,123,389). No obstante, la expresión de bombas de eflujo no parece haber sido alterada en los mutantes ni en los aislados naturales de *Sal* estudiados en esta tesis y sin embargo, otros genes como los codificantes de proteínas ribosomales, aquellos relacionados con respuesta al estrés, metabolismo, virulencia y membrana, son los que parecen haber participado en la respuesta adaptativa. Además de las bombas de eflujo, alteraciones en la síntesis de ácidos grasos debidas a cambios aminoacídicos en *FabI* pueden conferir tolerancia a TRI, algunos de ellos observados en los mutantes de *Ec* y *Sal* analizados (47,97). Sin embargo, también se identificaron numerosos cambios en el gen y en la proteína que no se relacionaron con CMI_{TRI} incrementada. En mutantes de *Kp*, bien tolerantes a TRI, bien con sensibilidad aumentada, no se detectaron cambios en *fabI*.

Los mutantes con mayor coste biológico tenían sobreexpresados los reguladores transcripcionales *marA* (*E. coli*) o *ramA* (*K. pneumoniae* y *S. enterica*). Aunque dicha sobreexpresión no se asoció en general con la de las bombas tipo AcrAB, es posible una expresión tardía de AcrAB durante la fase estacionaria o solamente en presencia de los antimicrobianos, o incluso un efecto más notorio sobre la expresión de *acrA* o *tolC* (genes no evaluados) (160). MarA y RamA son los principales reguladores de la expresión de porinas y de *tolC* en *E. coli*. En otras bacterias gramnegativas como *Klebsiella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, RamA regula también *marA* de forma directa o vía cascada de señalización (43). El mayor descenso de sensibilidad a CIP fue observado tanto en un mutante de *Kp* como en uno de *Ec* con *ramA* o *marA* sobreexpresados, los cuales parecen jugar un papel importante en la resistencia a CIP y otros antibióticos debido a su efecto sobre la activación de la bomba AcrAB-TolC (134,157,160). El regulador RamA parece influir además en la respuesta a numerosos compuestos, en la expresión de genes relacionados con multirresistencia, en genes corregulados por otros reguladores y genes implicados en rutas metabólicas (147). La extrapolación de que mutantes de *Sal* con *ramA* deleccionado utilizan mejor ciertos substratos como fuentes de carbono (147), explicaría el descenso de la capacidad de utilización de fuentes de carbono por parte de los mutantes de *Kp* con sobreexpresión de *ramA*. Los cambios en el metabolismo de algunos mutantes de *Ec* posiblemente estén relacionados con la sobreexpresión de *marA* que en este caso aumenta la habilidad metabólica (150,151), no pudiéndose descartar la implicación de reguladores alternativos para explicar otros fenotipos. De esta manera, hay que considerar la posibilidad de que algunos mutantes a biocidas pudiesen

evolucionar a cepas con mayor capacidad de adaptación o *fitness* en un ambiente selectivo.

Además del efecto de los *loci mar*, *sox* o *ram*, la sobreexpresión de PhoP, regulador de la ruta de modificación del lípido A en diferentes microorganismos, produce cambios estructurales de la membrana bacteriana que la hacen una barrera más robusta, aumentando indirectamente la virulencia y generando resistencia a polimixina y/o a BKC (ambos compuestos catiónicos con actividad sobre la pared bacteriana). El factor PagK, sobreexpresado en aislados naturales, está implicado en la modificación del LPS cuya expresión depende de PhoPQ (143). Estos resultados fueron previamente observados en mutantes de *Stenotrophomonas maltophilia* (Martínez, J.L., comunicación personal, datos no publicados).

El coste biológico de la resistencia a biocidas puede ser debido a déficits funcionales en diferentes procesos celulares a causa del incremento en la síntesis proteica o a cambios en el metabolismo que implicarían una posible disminución en la competencia y virulencia. Previamente se han descrito cambios en el *fitness* de mutantes TRI^R de *S. aureus* que conducen a una atenuación de la virulencia, reflejados también en cambios de la morfología colonial, crecimiento planctónico lento y formación de biofilms disfuncionales (53,195). Sin embargo, lo mismo no parece ocurrir en aislados clínicos, que presentan un *fitness* óptimo a pesar de la reducida sensibilidad a TRI (35,390). Aunque numerosos estudios han descrito que la resistencia a biocidas mediada por bombas de eflujo está asociada a una disminución de *fitness* del microorganismo (47,133,194,382), la inactivación de AcrAB, también puede reducir el *fitness* (118,121,391). En el caso de resistencia a TRI, se ha asociado la presencia de variantes de FabI o la sobreexpresión de esta proteína a una reducción de la tasa de crecimiento en *Salmonella* (383). En esta tesis se han obtenido mutantes con sensibilidad a biocidas alterada que crecen mejor que la cepa salvaje en medio rico, aunque aquellos con reducción de sensibilidad antimicrobiana más pronunciada presentaron un elevado coste biológico. No obstante, la aparición de mutaciones compensatorias pueden mejorar la carga de *fitness* de la mutación original durante la evolución sin presión selectiva (392) no siendo, por tanto, despreciable el riesgo de variantes con elevado coste. Los resultados sugieren que el coste de *fitness* depende de las mutaciones que se producen y que el hecho de que los mutantes con mayor coste puedan metabolizar mejor (en el caso de *Ec*) o peor (en el caso de *Kp*) algunas fuentes de carbono indicaría que ese coste dependería del medio en el que la bacteria se encuentre y de los nutrientes disponibles. A nivel poblacional se ha visto que los QACs pueden afectar a la estructura de

comunidades microbianas (393). De esta forma, en la naturaleza los efectos del estrés crónico a biocidas podrían complicarse por la competición entre los miembros de la comunidad microbiana, resultando en una expansión clonal de cepas menos sensibles.

Una alteración de la síntesis proteica generalizada ha sido observada tanto en aislados naturales con reducida sensibilidad a biocidas como en mutantes de distintos fenotipos de manera similar a lo que sucede tras la exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos (199). Tanto la frecuente resistencia a inhibidores de la síntesis proteica (TET, anfenicoles, macrólidos y puromicina) en mutantes de *Ec* y *Kp* (TRI^RBKC^R), como la expresión aumentada de diversos genes ribosomales, en el caso de *Sal*, indican que la actividad ribosómica puede ser relevante en la adaptación a biocidas como anteriormente ha sido observado en mutantes a QACs o con *ramA* inactivado (134,197,394). Estas alteraciones incluyen tanto la represión de genes codificantes de proteínas ribosomales, como ocurre tras la exposición al TRI de *Ec* y *Sal* (201,202), como la sobreexpresión de los mismos después del tratamiento con agentes oxidantes, fenólicos o QACs (cloruro de benzalconio) de *Sal* (35,191,206). La proteína ribosomal S13 con expresión aumentada en los mutantes obtenidos y en las cepas naturales, fue previamente identificada entre una genoteca de *E. coli* tras enriquecimiento con TRI hasta una concentración letal (395). No obstante, esta proteína estuvo sobreexpresada en cepas naturales TRI^R, BKC^RCHX^R y TRI^S, además de en dos mutantes TRI^RBKC^RCHX^R. Por otra parte, la proteína ribosomal S1 sobreexpresada en dos mutantes de *Sal* TRI^RBKC^RCHX^R fue previamente asociada con tolerancia al BKC en *E. coli* y en *S. enterica* tanto por una mutación como por su expresión disminuida (197,206). Estos mutantes con sobreexpresión de genes ribosomales tuvieron también afectada la expresión de genes asociados a la pared celular. Algunos de los cambios fenotípicos y genotípicos originados, sobre todo tras la exposición a QACs, se relacionan con alteraciones del peptidoglicano (17,102,191,204).

Otras alteraciones, también reflejan una respuesta generalizada al estrés y de adaptación que implican un aumento de la expresión génica de la proteína de respuesta al choque frío, asociada a la supervivencia de algunas especies bacterianas y previamente asociada con la exposición a BKC de biofilms de *S. enterica* (204,206), la reducción de RpoN (factor σ^{54}) y YobF. RpoN está implicado en la regulación de la transcripción de proteínas relacionadas con la biosíntesis de exopolisacáridos, lípidos, lipopolisacáridos, lipoproteínas, flagelos y peptidoglicano, y YobF es una proteína inducida cuando la bacteria se expone a diferentes sustancias y condiciones medioambientales. Mutaciones en la pequeña proteína YobF fueron asociadas a la

recuperación de la movilidad de mutantes de *E. coli* con un defecto en la misma, sin embargo, no fue identificado el mecanismo responsable (396).

La exposición a biocidas ha sido también asociada indirectamente a una alteración de la patogenicidad o epidemividad debido a diversos cambios metabólicos o de expresión de sistemas de secreción de tipo III, de PhoPQ (PagK) u otros, como estimulantes de la invasión de células eucariotas en clones de *Sal.* Varios de los azúcares referidos son transportados por el sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PTS) sugiriendo la afectación tanto positiva como negativa de este sistema dependiendo del mutante considerado. La capacidad para usar mejor componentes de la mucina (aminoácidos y carbohidratos glicosilados) sugiere una mejor colonización intestinal (397). Más específicamente los mutantes que metabolizan mejor 1,2-propanodiol, adonitol, ácido D-glucosamínico, D-psicose, arbutina o m-inositol podrían tener un mayor potencial de patogenicidad debido a diferentes mecanismos. El 1,2-propanodiol es metabolizado gracias al operón *pdu*, identificado en *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* e implicado en virulencia (398). Además una mejor metabolización del substrato ha sido previamente identificado en *S. enterica* expuesta a BKC (206). Por una parte, la metabolización de arbutina, salicilina, celobiose y amigdalina, azúcares de la familia aril-β-glucosidasa, transportados por el sistema PTS, depende de la activación de un operón críptico que evolucionó asociado a linajes de *Ec* más virulentos (filogrupo B2) (399), y por otra parte el fenotipo positivo para m-inositol fue altamente relacionado con respuesta inflamatoria en el hospedador (400). Además, el ácido D-glucosamínico origina N-acetil-D-glucosamina que está presente tanto en el peptidoglicano como en la mucosa intestinal sugiriendo que los mutantes que mejor lo metabolicen puedan ser más invasivos del tracto intestinal (397).

Por otro lado, mutantes resistentes a biocidas presentaron una menor expresión del SSTIII al igual que otros anteriormente descritos resistentes a antibióticos, indicando así una menor virulencia (149,194,401). Los resultados obtenidos en esta tesis reflejan tanto la represión del SSTIII como la sobreexpresión de otros elementos de virulencia en mutantes y aislados naturales de *Sal.* Este doble comportamiento existió también en relación a ciertas porinas. Otros genes metabólicos codificantes de la lisina descarboxilasa, piruvato quinasa, de la proteína de absorción de zinc y del sistema PTS, activados en respuesta al estrés generado por la exposición a biocidas podrían influir en la infectividad de las cepas salvajes y mutantes. El aumento de expresión de genes codificantes de enzimas glicolíticas (piruvato quinasa, PTS y otras) fue confirmado como potenciador de la resistencia a TRI ya que estas enzimas son afectadas por el biocida

(395,402). La expresión aumentada de piruvato quinasa en los mutantes y aislados clínicos podría relacionarse con la tolerancia al TRI debido a una disminución del metabolismo de los productos de la vía biosintética de *fab*, gen inhibido por el TRI, y el consecuente aumento de la producción de piruvato (47,201). Sin embargo, esta respuesta no fue uniforme en todas las cepas naturales y mutantes con un fenotipo común, estando aumentada tanto en mutantes de *Sal* TRI^RBKC^RCHX^R y BKC^R como en cepas naturales TRI^R, BKC^R o de sensibilidad normal. La expresión disminuida de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos en mutantes podría deberse a mecanismos compensatorios frente a la respuesta general al estrés producido por los agentes antimicrobianos. Al igual que en otros estudios, los genes codificantes de proteínas ribosomales, de proteínas relacionadas con el metabolismo y la membrana/virulencia (porinas), y de la proteína de choque al frío han tenido su expresión alterada aunque el perfil de genes y expresión fue distinto al de otros previamente obtenidos en *Ec* y *Sal* (201-203,206).

En resumen, la exposición a biocidas (TRI, CHX, BKC y NaOCl) y antibióticos (CIP, AMP y CAZ) da lugar a una serie de fenotipos y genotipos de disminución y aumento de sensibilidad a estos compuestos y a una alteración de los patrones metabólicos asociados a cambios en la expresión de *bombas de eflujo*, *reguladores globales*, *proteínas ribosomales*, mecanismos de *respuesta al estrés*, factores implicados en *virulencia*, *metabolismo* y síntesis de la membrana y de la pared celular. En algunos casos, con riesgo de desarrollo de resistencia cruzada a estos dos grupos de agentes antimicrobianos en diferentes enterobacterias. Diversos mecanismos intrínsecos y adquiridos son responsables de los patrones observados y afectan a uno o diferentes compuestos.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

Las **conclusiones** obtenidas del trabajo realizado en esta Tesis son:

1. Nuestros resultados demuestran que los genes adquiridos de resistencia a las sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*) y sales de amonio cuaternario (*qac*) se encuentran en un número limitado de integrones y/o transposones localizados en una gran variedad de plásmidos conjugativos, contenidos en aislamientos de *Enterobacteriaceae* de origen clínico y comunitario. Estas plataformas parecen haber contribuido de forma significativa a la adquisición de genes adaptativos y a la selección y persistencia de clones de esta familia de microorganismos.
2. Los estudios de caracterización genética y análisis poblacional de los elementos genéticos portadores de genes *sul2* (plataformas derivadas de plásmidos IncQ y asociadas a *ISCR2*) y *sul3* (integrones inusuales de clase 1 asociados a bombas de eflujo SMR) ponen de manifiesto diferentes eventos de captura, selección y diseminación.
3. El análisis fenotípico y genotípico de los distintos genes *sul* sugiere diferentes orígenes para dichos genes, así como la implicación de *sul2* y *sul3* pero no *sul1* en la resistencia a las sulfonamidas.
4. Las poblaciones naturales de enterobacterias predominantes en el ámbito hospitalario y veterinario con sensibilidad reducida a los biocidas son minoritarias, indicando un bajo riesgo de coselección entre antibióticos y biocidas en estos clones. La determinación de los puntos de corte epidemiológicos (ECOFFs) para biocidas contribuirá a una mejor detección de las poblaciones con menor sensibilidad y a establecer pautas para la mejor utilización de estos compuestos.
5. La diversidad de fenotipos y genotipos que confieren resistencia a biocidas (TRI, CHX, BKC y NaOCl) y antibióticos (CIP, AMP y CAZ) tras exposición *in vitro* a diferentes compuestos ampliamente usados en el medio hospitalario y veterinario, ponen de manifiesto el riesgo de desarrollo de resistencia cruzada a

estos dos grupos de agentes antimicrobianos en diferentes enterobacterias. Las variantes estables en los fenotipos, tanto de aumento como disminución de sensibilidad a biocidas/antibióticos, podrían reflejar la existencia de rutas compensatorias.

6. La tolerancia a biocidas se asoció a una variedad de mecanismos celulares. La contribución de bombas de expulsión tanto de localización cromosómica (AcrB-TolC) como en elementos de transferencia horizontal (SMR), no se asoció a la tolerancia a TRI, CHX, BKC, o NaOCl. Las alteraciones metabólicas junto con la variable expresión de genes relacionados con el metabolismo, respuesta al estrés, patogenicidad y síntesis proteica aumentada señalan la complejidad de las rutas adoptadas por los microorganismos para contrarrestar el daño provocado por los biocidas.

7. La respuesta al estrés, al choque frío y la detoxificación parecen tener un papel relevante en la resistencia adaptativa a biocidas tanto en mutantes como en clones naturales de *Salmonella enterica* con sensibilidad disminuida.

8. El análisis fenotípico y genotípico de las bombas de eflujo Qac, tradicionalmente asociadas a resistencia a compuestos de amonio cuaternario, sugiere que estos determinantes no juegan, contrariamente a lo que podría esperarse, un papel relevante en la resistencia a biocidas.

Bibliografía

6. BIBLIOGRAFÍA

El estilo de citación utilizado fue el *Vancouver*.

1. Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*. 1947;39(5):565-9.
2. Merlino J, Brown M. Biocides in the Health Industry. *Off. J. Aust. Soc. Microbiol. Inc.* 2010;31(4):158.
3. Cars O, Mölstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 2001 Jun 9;357(9271):1851-3.
4. Lord Soulsby. Antimicrobial resistance: animal use of antibiotics. *Oxford Textb. Zoonoses Biol. Clin. Pract. Public Heal. Control*. Oxford University Press; 2011. p. 38-42.
5. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart H-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:47.
6. Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. Antibiotics as intermicrobial signaling agents. 2006;103(51).
7. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012 Jan;8(6):e1002778.
8. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012 Jan 31;109(5):1691-6.
9. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:15.
10. Thomsen NA, Hammer KA, Riley T V. Tea-tree oil - a naturally occurring biocide. *Off. J. Aust. Soc. Microbiol. Inc.* 2010;31(4):182-4.
11. Russell A. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect. Dis.* 2003 Dec;3(12):794-803.
12. Carson RT, Larson E, Levy SB, Marshall BM, Aiello AE. Use of antibacterial consumer products containing quaternary ammonium compounds and drug resistance in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;62(5):1160-2.
13. Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D. Biocides--resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2013 Feb;22(2):191-206.
14. Van Hoek AH a M, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2011 Jan;2(September):203.
15. White DG, McDermott PF. Biocides, drug resistance and microbial evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001 Jun;4(3):313-7.
16. McDonnell G, Russell a D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 Jan;12(1):147-79.
17. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 2005;99(4):703-15.
18. Moore LE, Ledder RG, Gilbert P, McBain AJ. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008 Aug;74(15):4825-34.
19. McMurry LM, Oethinger M LS. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains

- of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. Sep 15. 1998;166(2):305-9.
20. McMurry LM, Oethinger M LS. Triclosan targets lipid synthesis. Nature. 1998 Aug 6;3. 1998;94(6693):531-2.
 21. Heath RJ, Rubin JR, Holland DR, Zhang E, Snow ME, Rock CO. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. J. Biol. Chem. 1999 Apr 16;274(16):11110-4.
 22. Regös J, Hitz HR. Investigations on the mode of action of Triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent. Zentralbl. Bakteriол. Orig. A. 1974 Mar;226(3):390-401.
 23. Saleh S, Haddadin RNS, Baillie S, Collier PJ. Triclosan - an update. Lett. Appl. Microbiol. 2011 Feb;52(2):87-95.
 24. Dukan S, Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. J. Bacteriol. 1996 Nov;178(21):6145-50.
 25. Larson EL MH. Alcohols. In: Febiger L&, editor. Disinfect. Steriliz. Preserv. Block SS,. Philadelphia, PA, USA; 1991. p. 191-203.
 26. Munton TJ, Russell AD. Aspects of the Action of Glutaraldehyde on *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol. 1970 Jun 11;33(2):410-9.
 27. Hamilton WA. Membrane-active anti-bacterial compounds. Inhib. Destr. Microb. cell. W. B. Hugo. London, England: Academic Press, Ltd.; 1971. p. 77-106.
 28. Bloomfield SF. Handbook of Disinfectants and Antiseptics. Ascenzi, J. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1996. p. 133-58.
 29. Silver AG and S. Silver as a biocide: Will resistance become a problem? Nat. Biotechnology. 1998;16(10):888.
 30. Oggioni MR, Furi L, Coelho JR, Maillard J-Y, Martínez JL. Recent advances in the potential interconnection between antimicrobial resistance to biocides and antibiotics. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2013 Apr;11(4):363-6.
 31. Marshall BM, Robleto E, Dumont T, Levy SB. The frequency of antibiotic-resistant bacteria in homes differing in their use of surface antibacterial agents. Curr. Microbiol. 2012 Oct;65(4):407-15.
 32. Davin-Regli A, Pagès JM. Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. Rev. Sci. Tech. 2012 Apr;31(1):89-104.
 33. Tkachenko O, Shepard J, Aris VM, Joy A, Bello A, Londono I, et al. A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. Res. Microbiol. 2007;158(8-9):651-8.
 34. Braoudaki M, Hilton AC. Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. FEMS Microbiol. Lett. 2004 Jun;235(2):305-9.
 35. Randall LP, Cooles SW, Coldham NG, Penuela EG, Mott AC, Woodward MJ, et al. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. J. Antimicrob. Chemother. 2007;60(September):1273-80.
 36. Karatzas KAG, Webber MA, Jorgensen F, Woodward MJ, Piddock LJ V, Humphrey TJ. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance , increased efflux and reduced invasiveness. J. Antimicrob. Chemother. 2007;60(September):947-55.
 37. Dibner J, Richards J. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poult. Sci. 2005 Apr 1;84(4):634-43.

38. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010 Sep;74(3):417-33.
39. Davies J. Sanitation: Sewage recycles antibiotic resistance. *Nature*. University of British Columbia, Vancouver, Canada.; 2012;487(7407):302.
40. Baquero F, Coque TM, de la Cruz F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Aug;55(8):3649-60.
41. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy M-C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 2012 Jan;3:119.
42. Martínez JL, Rojo F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011 Sep;35(5):768-89.
43. Masi M, Pagès J-M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in *Enterobacteriaceae*: the OmpF/C - TolC Case. *Open Microbiol. J.* 2013 Jan;7(1-M2):22-33.
44. Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, da Silva GJ, Nielsen KM. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog.* 2012 Jan;8(8):e1002837.
45. Maillard J-Y. Emergence of bacterial resistance to microbicides and antibiotics. *Off. J. Aust. Soc. Microbiol. Inc.* 2010;31(4):159-64.
46. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2009 Jan;78:119-46.
47. Webber MA, Randall LP, Cooles S, Woodward MJ, Piddock LJ V. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;62(1):83-91.
48. Nikaido H, Pagès J-M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012 Mar;36(2):340-63.
49. Bay DC, Rommens KL, Turner RJ. Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008;1778:1814-38.
50. Nielsen LN, Larsen MH, Skovgaard S, Kastbjerg V, Westh H, Gram L, et al. *Staphylococcus aureus* but not *Listeria monocytogenes* adapt to triclosan and adaptation correlates with increased fabI expression and agr deficiency. *BMC Microbiol.* 2013 Jul 30;13(1):177.
51. Derewacz DK, Goodwin CR, McNeese CR, McLean J a, Bachmann BO. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013 Feb 5;110(6):2336-41.
52. Leung CY, Chan YC, Samaranyake LP, Seneviratne CJ. Biocide resistance of *Candida* and *Escherichia coli* biofilms is associated with higher antioxidative capacities. *J. Hosp. Infect.* 2012 Jun;81(2):79-86.
53. Latimer J, Forbes S, McBain AJ. Attenuated virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* following sublethal exposure to triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Jun;56(6):3092-100.
54. Lubarsky H V, Gerbersdorf SU, Hubas C, Behrens S, Ricciardi F, Paterson DM. Impairment of the bacterial biofilm stability by triclosan. *PLoS One.* 2012 Jan;7(4):e31183.
55. Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, B Sanchez M, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:103.
56. Domagk G. Classics in infectious diseases. A contribution to the chemotherapy of bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 1986;8(1):163-6.

57. Sulek K. [Nobel prize for Gerhard Domagk in 1939 for discovery of the antibacterial activity of prontosil]. *Wiad. Lek.* 1968 Jun 15;21(12):1089.
58. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* 2000 Jun;3(3):155-60.
59. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995 Feb;39(2):279-89.
60. Skold OLA. R-Factor-Mediated Resistance to Sulfonamides by Dihydropteroate Synthase. 1976;9(1):49-54.
61. Perreten V, Boerlin P. A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1169-72.
62. Suzuki S, Ogo M, Miller TW, Shimizu A, Takada H, Siringan MAT. Who possesses drug resistance genes in the aquatic environment?: sulfamethoxazole (SMX) resistance genes among the bacterial community in water environment of Metro-Manila, Philippines. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:102.
63. Antunes P, Machado J, Peixe L. Dissemination of *sul3*-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1545-8.
64. Phuong Hoa PT, Nonaka L, Hung Viet P, Suzuki S. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Sci. Total Environ.* 2008 Nov 1;405(1-3):377-84.
65. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet. Scand.* 2010 Jan;52:47.
66. Kozak GK, Pearl DL, Parkman J, Reid-Smith RJ, Deckert A, Boerlin P. Distribution of sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from swine and chickens at abattoirs in Ontario and Québec, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009 Sep;75(18):5999-6001.
67. Curiao T, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque TM. Association of composite IS26-*sul3* elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 May;55(5):2451-7.
68. Gaze WH, Zhang L, Abdousslam N a, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J. Nature Publishing Group;* 2011 Aug;5(8):1253-61.
69. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S, Hall RM. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J. Med. Microbiol.* 2010 Nov;59(Pt 11):1331-9.
70. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3140-9.
71. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and *sul* genes in Portugal. *Front. Microbiol.* 2013;4(April):1-7.
72. Marchant M, Vinué L, Torres C, Moreno MA. Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Vet. Microbiol.* 2013 Apr 12;163(1-2):124-32.

73. Labar AS, Millman JS, Ruebush E, Opintan JA, Bishar RA, Aboderin AO, et al. Regional dissemination of a trimethoprim-resistance gene cassette via a successful transposable element. *PLoS One*. 2012 Jan;7(5):e38142.
74. Paulsen IANT, Littlejohn TIMG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold OLA, Swedberg G, et al. The 3' Conserved Segment of Integrons Contains a Gene Associated with Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(4):761-8.
75. Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol*. 2008 Jul 15;190(14):5095-100.
76. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol*. 2006 Aug;4(8):608-20.
77. Gillings MR. Biocide use, integrons and novel genetic elements. *Off. J. Aust. Soc. Microbiol. Inc*. 2010;31(4):192-4.
78. Sundin GW. Distinct recent lineages of the *strA*-*strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr. Microbiol*. 2002 Jul;45(1):63-9.
79. Fricke WF, Welch TJ, McDermott PF, Mammel MK, LeClerc JE, White DG, et al. Comparative genomics of the *IncA/C* multidrug resistance plasmid family. *J. Bacteriol*. 2009 Aug;191(15):4750-7.
80. Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding *IncA/C* plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One*. 2011 Jan;6(8):e23415.
81. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. *ISCR* elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2006 Jun;70(2):296-316.
82. Nonaka L, Maruyama F, Miyamoto M, Miyakoshi M, Kurokawa K, Masuda M. Novel conjugative transferable multiple drug resistance plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from marine aquaculture environment. *Microbes Environ*. 2012 Jan;27(3):263-72.
83. Trobos M, Lester CH, Olsen JE, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. Natural transfer of sulphonamide and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine. *J. Antimicrob. Chemother*. 2009 Jan;63(1):80-6.
84. Bean DC, Livermore DM, Hall LMC. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009 Mar;53(3):1088-93.
85. Köld OS. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Review. Vet. Res*. 2001;32(3-4):261-73.
86. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*. 2001 Apr 28;357(9265):1325-8.
87. Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LMC. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *J. Antimicrob. Chemother*. 2004 Jun;53(6):958-63.
88. Kumar I, Josephine HR, Pratt RF. Reactions of peptidoglycan-mimetic beta-lactams with penicillin-binding proteins in vivo and in membranes. *ACS Chem. Biol*. 2007 Sep 21;2(9):620-4.
89. Massova I, Mobashery S. Structural and mechanistic aspects of evolution of beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Curr. Pharm. Des*. 1999 Nov;5(11):929-37.
90. Zeng X, Lin J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol*. 2013 Jan;4:128.

91. Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008 Jan;14 Suppl 1:3-10.
92. Alvarez-Ortega C, Olivares J, Martínez JL. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:7.
93. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003 Dec;67(4):593-656.
94. Dupont M, James CE, Chevalier J, Pagès J-M. An early response to environmental stress involves regulation of OmpX and OmpF, two enterobacterial outer membrane pore-forming proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Sep 1;51(9):3190-8.
95. Braoudaki M, Hilton AC. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005 Jan;25(1):31-7.
96. Guérin-Méchin L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, Leveau JY. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *J. Appl. Microbiol.* 1999 Nov;87(5):735-42.
97. McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature.* 1998 Aug 6;394(6693):531-2.
98. Jaglic Z, Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role : a review. *Vet. Med. (Praha).* 2012;2012(6):275-81.
99. Paulsen IT, Brown MH, Skurrayl RA. Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microbiol. Rev.* 1996;60(4):575-608.
100. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 Sep;57(9):4449-62.
101. Tezel U, Pavlostathis SG. Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment. In: Keen PL, Montforts MHMM, editors. *Antimicrob. Resist. Environ.* John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 349-88.
102. Cheung H, Wong MM, Cheung S, Liang LY, Lam Y, Chiu S. Differential Actions of Chlorhexidine on the Cell Wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012;7(5):e36659.
103. Maseda H, Hashida Y, Konaka R, Shirai A, Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5230-5.
104. Holdsworth SR, Law CJ. The major facilitator superfamily transporter MdtM contributes to the intrinsic resistance of *Escherichia coli* to quaternary ammonium compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013 Apr;68(4):831-9.
105. Dubbs JM, Mongkolsuk S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. *J. Bacteriol.* 2012 Oct;194(20):5495-503.
106. Pages J-M, Lavigne J-P, Leflon-Guibout V, Marcon E, Bert F, Noussair L, et al. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 2009 Jan;4(3):e4817.
107. Lemos ML, Osorio CR. Integrating Conjugative Elements as Vectors of Antibiotic , Mercury , and Quaternary Ammonium Compound Resistance in Marine Aquaculture Environments. 2012;2619-26.
108. Buffet-Bataillon S, Le Jeune A, Le Gall-David S, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Molecular mechanisms of higher MICs of

- antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012 Dec;67(12):2837-42.
109. Webber MA, Piddock LJ V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;51(1):9-11.
110. Piddock LJ V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006;19(2):382-402.
111. Lars Hestbjerg Hansen, Lars Bogø Jensen, Heidi Iskou Sørensen and SJS. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *E. coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007;60:145-7.
112. Tauch A, Schlüter A, Bischoff N, Goesmann A, Meyer F, Pühler A. The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *bla*_{NPS-1}, and a tripartite antibiotic efflux system. *Mol. Genet. Genomics.* Springer-Verlag; 2003;268(5):570-84.
113. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001 Oct;183(20):5803-12.
114. Hassan KA, Baltzer SA, Paulsen IT, Brown M. Pumping out biocides - cause for concern? *Off. J. Aust. Soc. Microbiol. Inc.* 2010;31(4):178-81.
115. O'Regan E, Quinn T, Pagès J-M, McCusker M, Piddock L, Fanning S. Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar enteritidis: involvement of RamA and other global regulators. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Mar;53(3):1080-7.
116. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2005 Mar;187(6):1923-9.
117. Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009 Apr 28;106(17):7173-8.
118. Mark A. Webber, Andrew M. Bailey, Jessica M. A. Blair, Eirwen Morgan, Mark P. Stevens, Jay C. D. Hinton, Al Ivens, John Wain and LJVP. The Global Consequence of Disruption of the AcrAB-TolC Efflux Pump in *Salmonella enterica* Includes Reduced Expression of SPI-1 and Other Attributes Required To Infect the Host. *J. Bacteriol.* 2009;191(13):4276-85.
119. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T. Effect of Antimicrobial Exposure on AcrAB Expression in *Salmonella enterica* Subspecies enterica Serovar Choleraesuis. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:53.
120. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1993 Oct;175(19):6299-313.
121. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández M del C, Mallo S, Merino M, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Apr;56(4):2084-90.
122. Yerushalmi H, Lebendiker M, Schuldiner S. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa Multidrug Transporter, Exchanges Toxic Cations and H⁺ and Is Soluble in Organic Solvents. *J. Biol. Chem.* 1995 Mar 24;270(12):6856-63.

123. He G-X, Zhang C, Crow RR, Thorpe C, Chen H, Kumar S, et al. SugE, a new member of the SMR family of transporters, contributes to antimicrobial resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Aug;55(8):3954-7.
124. Bay DC, Turner RJ. Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evol. Biol.* 2009 Jan;9:140.
125. Jack DL, Yang NM, Saier MH. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 2001 Jul;268(13):3620-39.
126. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009 Jul;33(4):757-84.
127. Longtin J, Seah C, Siebert K, Mcgeer A, Simor A, Longtin Y, et al. Distribution of Antiseptic Resistance Genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2999-3001.
128. Díaz-Mejía JJ, Amábile-Cuevas CF, Rosas I, Souza V. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiology.* 2008 Jan;154(Pt 1):94-102.
129. Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2008 Apr;2(4):417-28.
130. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011 Jun;14(3):236-43.
131. Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 2007 Mar;9(3):657-66.
132. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Zhang L, Kay P, Boxall A, Hawkey PM, et al. Integron prevalence and diversity in manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011 Jan;77(2):684-7.
133. Xian-Zhi Li, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs.* 2009;69(12):1555-623.
134. Bailey AM, Ivens A, Kingsley R, Cottell JL, Wain J, Piddock LJ V. RamA, a member of the AraC/XylS family, influences both virulence and efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 2010 Mar;192(6):1607-16.
135. Warner DM, Levy SB. SoxS increases the expression of the zinc uptake system ZnuACB in an *Escherichia coli* murine pyelonephritis model. *J. Bacteriol.* 2012 Mar;194(5):1177-85.
136. Pérez A, Poza M, Aranda J, Latasa C, Medrano FJ, Tomás M, et al. Effect of transcriptional activators SoxS, RobA, and RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Dec;56(12):6256-66.
137. Casaz P, Garrity-Ryan LK, McKenney D, Jackson C, Levy SB, Tanaka SK, et al. MarA, SoxS and Rob function as virulence factors in an *Escherichia coli* murine model of ascending pyelonephritis. *Microbiology.* 2006 Dec;152(Pt 12):3643-50.
138. Coudeyras S, Nakusi L, Charbonnel N, Forestier C. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. *Infect. Immun.* 2008 Oct;76(10):4633-41.
139. De Majumdar S, Veleba M, Finn S, Fanning S, Schneiders T. Elucidating the Regulon of the Multi Drug Resistance

- Regulator RarA in *K. pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 Jan 14;(January).
140. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Mar;55(3):1211-21.
141. Chib S, Mahadevan S. Involvement of the global regulator H-NS in the survival of *Escherichia coli* in stationary phase. *J. Bacteriol.* 2012 Oct;194(19):5285-93.
142. Snyder E, Gordon DM, Stoebel DM. *Escherichia coli* lacking RpoS are rare in natural populations of non-pathogens. G3 (Bethesda). 2012 Nov;2(11):1341-4.
143. Murata T, Tseng W, Guina T, Miller SI, Nikaido H. PhoPQ-mediated regulation produces a more robust permeability barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 2007 Oct;189(20):7213-22.
144. Linares JF, Moreno R, Fajardo A, Martínez-Solano L, Escalante R, Rojo F, et al. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2010 Dec 3;12(12):3196-212.
145. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J. Biol. Chem.* 2008 Aug 29;283(35):24245-53.
146. Zheng J, Cui S, Meng J. Effect of transcriptional activators RamA and SoxS on expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 Jan;63(1):95-102.
147. Zheng J, Tian F, Cui S, Song J, Zhao S, Brown EW, et al. Differential gene expression by RamA in ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One.* 2011 Jan;6(7):e22161.
148. Nishino K, Yamaguchi A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004 Mar;186(5):1423-9.
149. Giraud E, Baucheron S, Virlogeux-Payant I, Nishino K, Cloeckeaert A. Effects of natural mutations in the ramRA locus on invasiveness of epidemic fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates. *J. Infect. Dis.* 2013 Mar 1;207(5):794-802.
150. Barbosa TM, Levy SB. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J. Bacteriol.* 2000 Jun;182(12):3467-74.
151. Ruiz C, Levy SB. Many chromosomal genes modulate MarA-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2125-34.
152. Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 2003 Jun;48(6):1609-19.
153. Chubiz LM, Glekas GD, Rao C V. Transcriptional cross talk within the mar-sox-rob regulon in *Escherichia coli* is limited to the rob and marRAB operons. *J. Bacteriol.* 2012 Sep;194(18):4867-75.
154. Seoane AS, Levy SB. Identification of new genes regulated by the marRAB operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1995 Feb;177(3):530-5.
155. Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella*

- pneumoniae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Aug;56(8):4450-8.
156. Bailey AM, Paulsen IT, Piddock LJ V. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008 Oct;52(10):3604-11.
157. Sun Y, Dai M, Hao H, Wang Y, Huang L, Almofti YA, et al. The role of RamA on the development of ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One.* 2011 Jan;6(8):e23471.
158. Van der Straaten T, Zulianello L, van Diepen A, Granger DL, Janssen R, van Dissel JT. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium RamA, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. *Infect. Immun.* 2004 Feb;72(2):996-1003.
159. Ricci V, Piddock LJ V. Ciprofloxacin selects for multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediated by at least two different pathways. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 May;63(5):909-16.
160. Chollet R, Chevalier J, Bollet C, Pages J-M, Davin-Regli A. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2518-23.
161. Ferenci T, Galbiati HF, Betteridge T, Phan K, Spira B. The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 2011 Jan;11:62.
162. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 2005 Mar;187(5):1591-603.
163. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, et al. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science.* 1997 Apr 11;276(5310):250-3.
164. Fraise AP. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J. Appl. Microbiol.* 2002 Jan;92 Suppl:158S-62S.
165. Girardo P, Reverdy M, Martra A, Fleurette J. Détermination de la concentration minimale bactéricide de trois antiseptiques et un désinfectant sur 580 souches de bacilles gram négatifs d'origine hospitalière. *Pathol. Biol.* 1989;37(5):605-11.
166. Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J. Hosp. Infect.* 2010 Nov;76(3):200-5.
167. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006 May;12(5):418-25.
168. Rensch U, Klein G, Schwarz S, Kaspar H, de Jong A, Kehrenberg C. Comparative Analysis of the Susceptibility to Triclosan and Three Other Biocides of Avian *Salmonella enterica* Isolates Collected 1979 through 1994 and 2004 through 2010. *J. Food Prot.* 2013 Apr;76(4):653-6.
169. Copitch JL, Whitehead RN, Webber MA. Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010;36:247-51.
170. Assadian O, Wehse K, Hübner N-O, Koburger T, Bagel S, Jethon F, et al. Minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of polihexanide and triclosan against antibiotic sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. *GMS*

- Krankenhhyg. Interdiszip. 2011 Jan;6(1):Doc06. antibiotic resistance. J Ind Microbiol Biotechnol. 2002;29(6):326-30.
171. Aiello AE, Larson EL, Levy SB. Consumer antibacterial soaps: effective or just risky? Clin. Infect. Dis. 2007 Sep 1;45 Suppl 2:S137-47.
 172. Aiello AE, Larson E. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. Lancet Infect Dis. 2003;3(August):501-6.
 173. Cottell A, Denyer SP, Hanlon GW, Ochs D, Maillard J-Y. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. J. Hosp. Infect. 2009 May;72(1):71-6.
 174. Aiello AE, Marshall B, Levy SB, Della-Latta P, Larson E. Relationship between triclosan and susceptibilities of bacteria isolated from hands in the community. Antimicrob. Agents Chemother. 2004 Aug;48(8):2973-9.
 175. Lear JC, Maillard J-Y, Dettmar PW, Goddard PA, Russell AD. Chloroxylenol- and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002 Nov;29(5):238-42.
 176. Suller MT, Russell AD. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. 2000 Jul;46(1):11-8.
 177. El Behiry A, Schlenker G, Szabo I, Roesler U. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. J. Vet. Sci. 2012 Jun;13(2):153-61.
 178. Schmid MB, Kaplan N. Reduced triclosan susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 2004 Apr;48(4):1397-9.
 179. McBain AJ, Rickard AH GP. Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial
 180. Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C, et al. Efficacy of Biocides Used in the Modern Food Industry To Control *Salmonella enterica*, and Links between Biocide Tolerance and Resistance to Clinically Relevant Antimicrobial Compounds. Appl Env. Microbiol. 2012;3087-97.
 181. Gilbert P, McBain AJ. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2003 Apr;16(2):189-208.
 182. Randall LP, Cooles SW, Piddock LJ V, Woodward MJ. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. J. Antimicrob. Chemother. 2004;54(3):621-7.
 183. Mavri A, Smole Možina S. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. Int. J. Food Microbiol. 2013 Jan 1;160(3):304-12.
 184. Christensen EG, Gram L, Kastbjerg VG. Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. 2011 Sep;55(9):4064-71.
 185. Ledder RG, Gilbert P, Willis C, McBain AJ. Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. J. Appl. Microbiol. 2006 May;100(5):1132-40.
 186. Soumet C, Fourreau E, Legrandois P, Maris P. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. Elsevier B.V.; 2012 Jul 6;158(1-2):147-52.
 187. Braoudaki M, Hilton AC. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica*

- and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 2004 Jan;42(1):73-8.
188. Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GTA. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology.* 2010 Jan;156(Pt 1):30-8.
189. Langsrud S, Sundheim G, Holck AL. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *J. Appl. Microbiol.* 2004;(96):201-8.
190. Randall LP, Cooles SUEW, Sayers AR, Woodward MJ. Association between cyclohexane resistance in *Salmonella* of different serovars and increased resistance to multiple antibiotics, disinfectants and dyes. *J. med. microbiol.* 2001;50(10):919-24.
191. Karatzas KAG, Randall LP, Webber M, Piddock LJ V, Humphrey TJ, Woodward MJ, et al. Phenotypic and Proteomic Characterization of Multiply Antibiotic-Resistant Variants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Selected Following Exposure to Disinfectants †. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74(5):1508-16.
192. Bailey AM, Webber MA, Piddock LJ V. Medium Plays a Role in Determining Expression of *acrB*, *marA*, and *soxS* in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1071-4.
193. Pester D, Milčevićová R, Schaffer J, Wilhelm E, Blümel S. *Erwinia amylovora* expresses fast and simultaneously *hrp/dsp* virulence genes during flower infection on apple trees. *PLoS One.* 2012 Jan;7(3):e32583.
194. Linares JF, López JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martínez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2005 Feb;187(4):1384-91.
195. Seaman PF, Ochs D, Day MJ. Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007 Jan;59(1):43-50.
196. Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard J-Y. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J. Appl. Microbiol.* 2012 Sep;113(3):485-98.
197. Moen B, Rudi K, Bore E, Langsrud S. Subminimal Inhibitory Concentrations of the Disinfectant Benzalkonium Chloride Select for a Tolerant Subpopulation of *Escherichia coli* with Inheritable Characteristics. *Int. J. Mol. Sci.* 2012 Jan;13(4):4101-23.
198. Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:4.
199. Davies J, Spiegelman GB, Yim G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006 Oct;9(5):445-53.
200. Goh E-B, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG, Davies J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002 Dec 24;99(26):17025-30.
201. Bailey AM, Constantinidou C, Ivens A, Garvey MI, Webber MA, Coldham N, et al. Exposure of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to triclosan induces a species-specific response, including drug detoxification. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;64(September):973-85.
202. Condell O, Sheridan Á, Power KA, Bonilla-Santiago R, Sergeant K, Renaut J, et al. Comparative proteomic analysis of *Salmonella* tolerance to the biocide active agent triclosan. *J. Proteomics.* 2012 Jul 19;75(14):4505-19.

203. Sheridan Á, Lenahan M, Condell O, Bonilla-Santiago R, Sergeant K, Renaut J, et al. Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H19. *J. Proteomics*. 2013 Mar 27;80(0):78-90.
204. Fox EM, Leonard N, Jordan K. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011 Sep;77(18):6559-69.
205. Kastbjerg VG, Larsen MH, Gram L, Ingmer H, Vicky G, Kastbjerg MHLGHI. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010 Jan;76(1):303-9.
206. Mangalappalli-Illathu AK, Korber DR. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Nov;50(11):3588-96.
207. Sabarly V, Bouvet O, Glodt J, Clermont O, Skurnik D, Diancourt L, et al. The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. *J. Evol. Biol.* 2011 Jul;24(7):1559-71.
208. Baumler DJ, Peplinski RG, Reed JL, Glasner JD, Perna NT. The evolution of metabolic networks of *E. coli*. *BMC Syst. Biol.* 2011 Jan;5:182.
209. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group; 2009;10(1):57-63.
210. Shea A, Wolcott M, Daefler S, Rozak DA. Biolog phenotype microarrays. *Methods Mol. Biol.* 2012 Jan;881:331-73.
211. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group; 2010;11(1):31-46.
212. Khatri B, Fielder M, Jones G, Newell W, Abu-Oun M, Wheeler PR. High throughput phenotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains' metabolism using biolog phenotype microarrays. *PLoS One.* 2013 Jan;8(1):e52673.
213. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl S347-57.
214. Baquero F, Coque TM. Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011 Sep;35(5):705-6.
215. Woodford N, Turton J, Livermore D. Multi-resistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011;35(5):736-55.
216. U.S. Department of Health and Human services. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. CDC; 2013.
217. Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PHM, Wolffs PFG. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:87.
218. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1179-84.
219. Fasano A. Bacterial infections: small intestine and colon. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2001 Jan;17(1):4-9.
220. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 2005 Sep 15;41(6):848-54.

221. Ishii S, Ksoll WB, Hicks RE, Sadowsky MJ. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):612-21.
222. Ishii S, Yan T, Vu H, Hansen DL, Hicks RE, Sadowsky MJ. Factors Controlling Long-Term Survival and Growth of Naturalized *Escherichia coli* Populations in Temperate Field Soils. *Microbes Environ.* 2010;25(1):8-14.
223. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller RHY. Manual of clinical microbiology. 8^a edición. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (ASM); 2003.
224. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 Oct;66(10):4555-8.
225. Clermont O, Gordon DM, Brisse S, Walk ST, Denamur E. Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: rapid identification and prevalence. *Environ. Microbiol.* 2011 Sep;13(9):2468-77.
226. Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac'h A, Rode L, Salgado E, Amorin C, Gouriou S, Picard B, Rahimy MC, Andremont A, Denamur E RR. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Env. Microbiol.* 2004;70(9):5698-700.
227. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* 2008 Feb;14(2):195-200.
228. Valverde A, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, Novais A, Galán JC, Alvarado A, et al. Spread of *bla*(CTX-M-14) is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5204-12.
229. Azu G, Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. 2001;915-24.
230. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One.* 2009 Jan;4(3):e4982.
231. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008 Dec;62(6):1261-4.
232. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J. Clin. Microbiol.* 2009 Nov;47(11):3793-4.
233. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):3002-6.
234. Andrade LN, Darini a. LDC, Curiao T, Baquero F, Canton R, Coque TM. Reply to "Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Brazilian Hospitals." *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Jul 23;56(8):4565-4565.
235. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil.

- Antimicrob. Agents Chemother. 2011;55(7):3579-83.
236. Ko KS, Lee J-Y, Baek JY, Suh J-Y, Lee MY, Choi JY, et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J. Med. Microbiol.* 2010 Jul;59(Pt 7):822-8.
237. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466-75.
238. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of *bla* KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(8):1608-14.
239. Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* 2012 May;50(5):1558-63.
240. Martínez JL. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2011 Jan;2:265.
241. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among *fi* - R factors. *Nature.* 1971 Nov 26;234(5326):222-3.
242. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods.* 2005 Dec;63(3):219-28.
243. Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One.* 2012 Jan;7(7):e40438.
244. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009 May;33(3):657-87.
245. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Lori A, Colino C, Villa L, et al. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg. Infect. Dis.* 2006 Jul;12(7):1145-8.
246. Taylor DE, Gibreel A, Lawley TD, Tracz DM. Antibiotic resistance plasmids. *Plasmid Biol. Amer. Society for Microbiology;* 2004;473-91.
247. Fricke WF, McDermott PF, Mammel MK, Zhao S, Johnson TJ, Rasko DA, et al. Antimicrobial resistance-conferring plasmids with similarity to virulence plasmids from avian pathogenic *Escherichia coli* strains in *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolates from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009 Sep;75(18):5963-71.
248. Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM, et al. Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2010 May;78(5):1931-42.
249. DebRoy C, Sidhu MS, Sarker U, Jayarao BM, Stell AL, Bell NP, et al. Complete sequence of pEC14_114, a highly conserved IncFIB/FIIA plasmid associated with uropathogenic *Escherichia coli* cystitis strains. *Plasmid.* 2010 Jan;63(1):53-60.
250. Meyer R. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid.* 2009 Sep;62(2):57-70.
251. Smalla K, Heuer H, Götz A, Niemeyer D, Krögerrecklenfort E, Tietze E. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000 Nov;66(11):4854-62.

252. Zioga A, Whichard JM, Kotsakis SD, Tzouveleakis LS, Tzelepi E, Miriagou V. CMY-31 and CMY-36 cephalosporinases encoded by ColE1-like plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Mar;53(3):1256-9.
253. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty B a, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla_{KPC}* carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 May;53(5):1998-2004.
254. Yau S, Liu X, Djordjevic SP, Hall RM. RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. *Microb. Drug Resist.* 2010 Dec;16(4):249-52.
255. Petrova M, Gorlenko Z, Mindlin S. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Res. Microbiol.* 2011 Apr;162(3):337-45.
256. Mindlin S, Minakhin L, Petrova M, Kholodii G, Minakhina S, Gorlenko Z, et al. Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Res. Microbiol.* 2005 Dec;156(10):994-1004.
257. Cain AK, Liu X, Djordjevic SP, Hall RM. Transposons related to Tn1696 in IncHI2 plasmids in multiply antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Australian animals. *Microb. Drug Resist.* 2010 Sep;16(3):197-202.
258. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999 Sep;63(3):507-22.
259. Mahillon J, Chandler M. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998 Sep 1;62(3):725-74.
260. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011 Sep;35(5):820-55.
261. Partridge SR, Hall RM. The IS1111 Family Members IS4321 and IS5075 Have Subterminal Inverted Repeats and Target the Terminal Inverted Repeats of Tn21 Family Transposons. *J. Bacteriol.* 2003 Oct 15;185(21):6371-84.
262. Doublet B, Praud K, Weill F-X, Cloeckaert A. Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 Mar;63(2):282-9.
263. Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J. Bacteriol.* 1994 Oct;176(20):6286-94.
264. Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 1989 Dec;3(12):1669-83.
265. Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004 May 4;101(18):7118-22.
266. Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, Stokes HW. Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Aug;55(8):3939-43.
267. Dawes FE, Kuzevski A, Bettelheim K a, Hornitzky M a, Djordjevic SP, Walker MJ. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS One.* 2010 Jan;5(9):e12754.

268. Targant H, Doublet B, Aarestrup FM, Cloeckeaert A, Madec J-Y. IS6100-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010 Jul 1;65(7):1543-5.
269. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999 Nov;18(11):761-70.
270. Sajjad A, Holley MP, Labbate M, Stokes HW, Gillings MR. Preclinical class 1 integron with a complete Tn402-like transposition module. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011 Jan;77(1):335-7.
271. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 2007 Jul;15(7):301-9.
272. Tetu SG, Holmes AJ. A family of insertion sequences that impacts integrons by specific targeting of gene cassette recombination sites, the IS1111-attC Group. *J. Bacteriol.* 2008 Jul;190(14):4959-70.
273. Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):320-7.
274. Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirer L, Bacte S De. Characterization of In53 , a Class 1 Plasmid- and Composite Transposon-Located Integron of *Escherichia coli* Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes. *J. Bacteriol.* 2001;183(1):235-49.
275. González R G, Mella M S, Zemelman Z R, Bello T H, Domínguez Y M. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev. Med. Chil. Sociedad Médica de Santiago*; 2004;132(5):619-26.
276. Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán J-C, Rollán A, Peixe L, et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005 May;49(5):1823-9.
277. Novais A, Baquero F, Machado E, Cantón R, Peixe L, Coque TM. International spread and persistence of TEM-24 is caused by the confluence of highly penetrating *enterobacteriaceae* clones and an IncA/C2 plasmid containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010 Mar;54(2):825-34.
278. Novais A, Cantón R, Valverde A, Machado E, Galán J-C, Peixe L, et al. Dissemination and persistence of bla_{CTX-M-9} are linked to class 1 integrons containing CR1 associated with defective transposon derivatives from Tn402 located in early antibiotic resistance plasmids of IncHI2, IncP1-alpha, and IncFI groups. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Aug;50(8):2741-50.
279. Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):796-9.
280. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002 Feb;46(2):500-10.
281. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin. Infect. Dis.* 2007 Nov 1;45(9):1171-8.

282. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013 Jun 20;68(11):2487-92.
283. Wayne P. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard – Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Clin. Lab. Stand. Inst. 2009.
284. Institute C and LS, editor. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twentieth Informational Supplement. CLSI. Wayne, P.A.; 2010.
285. Webber M, Coldham N. Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. *Antibiot. Resist. Protoc.* 2010;
286. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, Carvalho CCCR De, et al. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. 2009;13:1-13.
287. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif. Elsevier*; 2001;25(4):402-8.
288. Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* 2001 Jul;11(7):1246-55.
289. Sambrook J, Fritsch E.F. MT. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Sprin. Mol. Cloning A Lab. Man. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
290. Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J. Clin. Microbiol.* 1997 Nov;35(11):2977-80.
291. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 1995 Apr 10;226(2):235-40.
292. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.
293. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 2006 Jun;60(5):1136-51.
294. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4178-82.
295. Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004 Oct;10(10):942-5.
296. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* 1988 Sep;52(3):375-95.
297. García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, et al. Multilocus sequence typing of Inc11 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008 Jun;61(6):1229-33.
298. Heuer H, Kopmann C, Binh CTT, Top EM, Smalla K. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environ. Microbiol.* 2009 Apr;11(4):937-49.

299. Kern MB. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002 Sep 20;50(4):513-6.
300. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan;32(5):1792-7.
301. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
302. Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 1986 Sep;3(5):418-26.
303. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F, et al. Preservation of integron types among *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):2201-4.
304. Novais Â. Unidades de Captura y Dispersión Génica en la Evolución de las β -lactamasas de espectro extendido. Thesis. Universidad Complutense de Madrid; 2008.
305. Machado E. Epidemiology of genes encoding ESBLs and associated genetic elements among *Enterobacteriaceae* from different environments. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto; 2006.
306. Zhao F, Bai J, Wu J, Liu J, Zhou M, Xia S, et al. Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2010 Jan;5(4):e10141.
307. Billard-Pomares T, Tenailon O, Le Nagard H, Rouy Z, Cruveiller S, Médigue C, et al. Complete nucleotide sequence of plasmid pTN48, encoding the CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* O102-ST405 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011 Mar;55(3):1270-3.
308. Liu J, Keelan P, Bennett PM, Enne VI. Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef(B)*, found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 Mar;63(3):423-6.
309. Lee M-F, Chen Y-H, Peng C-F. Molecular characterisation of class 1 integrons in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from southern Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009 Mar;33(3):216-22.
310. Phuong Hoa PT, Nonaka L, Hung Viet P, Suzuki S. Detection of the *sul1*, *sul2*, and *sul3* genes in sulfonamide-resistant bacteria from wastewater and shrimp ponds of north Vietnam. *Sci. Total Environ.* 2008 Nov;405(1-3):377-84.
311. Post V, Hall RM. Insertion sequences in the IS1111 family that target the attC recombination sites of integron-associated gene cassettes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009 Jan;290(2):182-7.
312. Courvalin P, Lambert T. Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a Class 1 Integron with Two New Gene Cassettes, *cmlA2* and *qacF*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(10):2557-63.
313. Thorsted PB, Macartney DP, Akhtar P, Haines AS, Ali N, Davidson P, et al. Complete sequence of the IncPB plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. *J. Mol. Biol.* 1998;282(5):969-90.
314. Yooseph S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families. *PLoS Biol.* 2007;5(3):e16.
315. Betteridge T, Partridge SR, Iredell JR, Stokes HW. Genetic Context and Structural

- Diversity of Class 1 Integrons from Human Commensal Bacteria in a Hospital Intensive Care Unit †. 2011;55(8):3939-43.
316. Gillings MR, Xuejun D, Hardwick SA, Holley MP. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons? ISME J. 2009;3(2):209-15.
317. Su Z, Dai X, Chen J, Kong F, Wang H, Li Y, et al. The *bla*_{CTX-M-1} gene located in a novel complex class I integron bearing an ISCR1 element in *Escherichia coli* isolates from Zhenjiang, China. J. Antimicrob. Chemother. 2008 Jul 18;62(5):1150-1.
318. Giske CG, Libisch B, Colinson C, Scoulica E, Pagani L, Füzi M, et al. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 2006. p. 4309-15.
319. Walsh TR, Toleman M a, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying *bla*_{VIM-2} in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J. Antimicrob. Chemother. 2003 Jul;52(1):116-9.
320. Li D, Yang M, Hu J, Zhang J, Liu R, Gu X, et al. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. Environ. Microbiol. 2009 Jun;11(6):1506-17.
321. Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. Antimicrob. Agents Chemother. 2006 Jul;50(7):2493-9.
322. Yum JH, Yong D, Lee K, Kim H-S, Chong Y. A new integron carrying VIM-2 metallo-β-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Elsevier Biomedical; 2002. p. 217-9.
323. Gillings MR, Holley MP, Stokes HW. Evidence for dynamic exchange of *qac* gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 2009 Jun;296(2):282-8.
324. L'Abée-Lund TM, Sørum H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. Microb. Drug Resist. 2001 Jan;7(3):263-72.
325. Chang Y-C, Shih DY-C, Wang J-Y, Yang S-S. Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. Elsevier Biomedical; 2007. p. 191-7.
326. Verner-Jeffreys DW, Welch TJ, Schwarz T, Pond MJ, Woodward MJ, Haig SJ, et al. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. PLoS One. 2009 Jan;4(12):e8388.
327. Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 2001 Mar;45(3):710-4.
328. Koh TH, Sng L-H, Wang GCY, Hsu L-Y, Zhao Y. IMP-4 and OXA beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. J. Antimicrob. Chemother. 2007 Apr 1;59(4):627-32.
329. Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. J. Hosp. Infect. 2008 Jan;68(1):73-82.
330. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi ELB, Labia R, Nordmann P. Molecular and Biochemical Characterization of VEB-1, a Novel Class A Extended-Spectrum Beta-

- Lactamase Encoded by an *Escherichia coli* Integron Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(3):573-81.
331. Del Castillo CS, Hikima J-I, Jang H-B, Nho S-W, Jung T-S, Wongtavatchai J, et al. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):120-9.
332. Colinet C, Jocktane D, Brothier E, Rossolini GM, Cournoyer B, Nazaret S. Genetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy captive snakes: evidence of high inter- and intrasite dissemination and occurrence of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 2010 Mar;12(3):716-29.
333. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4930-3.
334. Krauland M, Harrison L, Paterson D, Marsh J. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Curr. Microbiol.* 2010 Mar;60(3):217-23.
335. Chiu C-H, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, et al. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan;33(5):1690-8.
336. Fabre L, Delauné A, Espié E, Nygard K, Pardos M, Polomack L, et al. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-15} in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 May;53(5):1808-16.
337. Garza-Ramos U, Morfin-Otero R, Sader HS, Jones RN, Hernández E, Rodríguez-Noriega E, et al. Metallo-beta-lactamase gene *bla*(IMP-15) in a class 1 integron, In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008 Aug;52(8):2943-6.
338. Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pu A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003;45(3):239-52.
339. Koh TH, Yamaguchi K, Ishii Y. Characterisation of the metallo-β-lactamase VIM-6 and its genetic support. *Int. J. Antimicrob. Agents.* Elsevier Science Publishers,; 2008. p. 446-9.
340. Segura P a, François M, Gagnon C, Sauvé S. Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ. Health Perspect.* 2009 May;117(5):675-84.
341. Bean DC, Livermore DM, Papa I, Hall LMC. Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005 Nov;56(5):962-4.
342. Kristiansson E, Fick J, Janzon A, Grabic R, Rutgersson C, Weijdegård B, et al. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS One.* 2011 Jan;6(2):e17038.
343. Nardelli M, Scalzo PM, Ramírez MS, Quiroga MP, Cassini MH, Centrón D. Class 1 integrons in environments with different degrees of urbanization. *PLoS One.* 2012 Jan;7(6):e39223.
344. Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO a, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science.* 2012 Aug 31;337(6098):1107-11.
345. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese

- Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005 Feb;49(2):836-9.
346. Guerra B, Junker E, Helmuth R. Incidence of the Recently Described Sulfonamide Resistance Gene *sul3* among German *Salmonella enterica* Strains Isolated from Livestock and Food. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2712-5.
347. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall ABA, Hawkey PM, Wellington EMH. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):696-702.
348. Chuanchuen R, Padungtod P. Antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 2009 Oct;71(10):1349-55.
349. Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M, Ruiz J, Llovet-Lombarte MI, Jardí-Baiges AM, et al. Multidrug resistance related to class 1 integrons in human *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates and emergence of atypical *sul3*-associated integrons. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009 Oct;34(4):381-3.
350. Díaz MA, Hernández-Bello JR, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L, Calvo J, Blanco J, et al. Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J. Clin. Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2840-5.
351. Rodríguez-Baño J, Alcalá J, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, et al. *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum beta-lactamase is a significant cause of community-acquired infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 Apr;63(4):781-4.
352. Johnson TJ, Logue CM, Johnson JR, Kuskowski MA, Sherwood JS, Barnes HJ, et al. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012 Jan;9(1):37-46.
353. Wang J, Stephan R, Karczmarczyk M, Yan Q, Hächler H, Fanning S. Molecular characterization of *bla* ESBL-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Front. Microbiol.* 2013 Jan;4:188.
354. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Vet. Scand.* 2010 Jan;52:47.
355. Hilty M, Betsch BY, Bögli-Stuber K, Heiniger N, Stadler M, Marianne Küffer, Andreas Kronenberg CR, et al. Transmission Dynamics of Extended-Spectrum β -lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in the Tertiary Care Hospital and the Household Setting. *Clin Infect Dis.* 2012;55(7):967-75.
356. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2010 Sep;16(9):1349-56.
357. Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, et al. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(1):60-6.
358. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011 Sep;35(5):912-35.
359. Enne VI, Delsol A a, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Sep;50(9):3003-10.

360. Skold O. R-Factor-Mediated Resistance to Sulfonamides by a Plasmid-Borne, Drug-Resistant Dihydropteroate Synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976 Jan 1;9(1):49-54.
361. Swedberg G, Sköld O. Plasmid-borne sulfonamide resistance determinants studied by restriction enzyme analysis. *J. Bacteriol.* 1983 Mar;153(3):1228-37.
362. Sundström L, Rådström P, Swedberg G, Sköld O. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sull* and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet.* 1988 Aug;213(2-3):191-201.
363. Valderas MW, Andi B, Barrow WW, Cook PF. Examination of intrinsic sulfonamide resistance in *Bacillus anthracis*: a novel assay for dihydropteroate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008 May;1780(5):848-53.
364. (SCENIHR) SC on E and NIHR. Research strategy to address the knowledge gaps on the antimicrobial resistance effects of biocides. Brussels, Belgium: European Commission, Directorate-General for Health & Consumers; 2010.
365. Technology TPO of S and. Antibiotic Resistance in the Environment, POSTnote 446. 2013. p. 1-5.
366. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SGB. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J. Hosp. Infect.* 2012 Jun;81(2):87-91.
367. Liguori G, Bagattini M, Gallè F, Quartucci V, Di Onofrio V, Negrone M, et al. Microbiological evaluation of the efficacy of two new biodetergents on multidrug-resistant nosocomial pathogens. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2009 Jan;8:35.
368. Beier RC, Anderson PN, Hume ME, Poole TL, Duke SE, Crippen TL, et al. Characterization of *Salmonella enterica* Isolates from Turkeys in Commercial Processing Plants for Resistance to Antibiotics, Disinfectants, and a Growth Promoter. 2011;8(5).
369. Rose H, Baldwin A, Dowson CG, Mahenthiralingam E. Biocide susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 Mar;63(3):502-10.
370. Kastbjerg VG, Gram L. Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *Int. J. Food Microbiol.* 2012 Nov 1;160(1):11-5.
371. Larson EL, Gomez-Duarte C, Lee L V., Della-Latta P, Kain DJ, Keswick BH. Microbial flora of hands of homemakers. *Am. J. Infect. Control.* 2003 Apr;31(2):72-9.
372. Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EMH. Incidence of Class 1 Integrons in a Quaternary Ammonium Compound-Polluted Environment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):1802-7.
373. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* 1996 Jan 1;178(1):306-8.
374. Chung YJ, Saier MH. Overexpression of the *Escherichia coli sugE* gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J. Bacteriol.* 2002 May;184(9):2543-5.
375. Moken MC, McMurry LM, Levy SB. Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and *acrAB* loci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997 Dec;41(12):2770-2.
376. Kanjee U, Gutsche I, Alexopoulos E, Zhao B, El Bakkouri M, Thibault G, et al. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the

- inducible lysine decarboxylase. *EMBO J.* 2011 Mar 2;30(5):931-44.
377. Hwang J, Mattei LM, VanArendonk LG, Meneely PM, Okeke IN. A pathoadaptive deletion in an enteroaggregative *Escherichia coli* outbreak strain enhances virulence in a *Caenorhabditis elegans* model. *Infect. Immun.* 2010 Sep;78(9):4068-76.
378. Corbett D, Wang J, Schuler S, Lopez-Castejon G, Glenn S, Brough D, et al. Two zinc uptake systems contribute to the full virulence of *Listeria monocytogenes* during growth *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 2012 Jan;80(1):14-21.
379. Francke C, Groot Kormelink T, Hagemeyer Y, Overmars L, Sluijter V, Moezelaar R, et al. Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics.* BioMed Central Ltd; 2011 Jan;12(1):385.
380. Hobbs EC, Astarita JL, Storz G. Small RNAs and small proteins involved in resistance to cell envelope stress and acid shock in *Escherichia coli*: analysis of a bar-coded mutant collection. *J. Bacteriol.* 2010 Jan;192(1):59-67.
381. Hemm MR, Paul BJ, Miranda-Ríos J, Zhang A, Soltanzad N, Storz G. Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *J. Bacteriol.* 2010 Jan;192(1):46-58.
382. Whitehead RN, Overton TW, Kemp CL, Webber MA. Exposure of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to High Level Biocide Challenge Can Select Multidrug Resistant Mutants in a Single Step. *PLoS One.* 2011;6(7):e22833.
383. Rensch U, Klein G, Kehrenberg C. Analysis of Triclosan-Selected *Salmonella enterica* Mutants of Eight Serovars Revealed Increased Aminoglycoside Susceptibility and Reduced Growth Rates. *PLoS One.* 2013 Jan;8(10):e78310.
384. Kawamura-sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65(June):1975-83.
385. Joynson JA, Forbes B, Lambert RJW. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *J. Appl. Microbiol.* 2002 Jan;93(1):96-107.
386. Rakic-Martinez Mira , Drevets Douglas A., Dutta Vikrant, Katic Vera and KS. *Listeria monocytogenes* Strains Selected on Ciprofloxacin or the BKC exhibited reduced susceptibility to Cip, Gen, BKC and other toxic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(24):8714-21.
387. Chen S, Cui S, Mcdermott PF, Zhao S, White DG, Paulsen I, et al. Contribution of Target Gene Mutations and Efflux to Decreased Susceptibility of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Fluoroquinolones and Other Antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):535-42.
388. Soo VWC, Hanson-Manful P, Patrick WM. Artificial gene amplification reveals an abundance of promiscuous resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011 Jan 25;108(4):1484-9.
389. Son MS, Castilho D, Duncalf KA, Carney D, Weiner JH, Turner RJ. Mutagenesis of SugE, a small multidrug resistance protein. 2003;312:914-21.
390. Oggioni MR, Ciusa ML, Furi L, Baldassarri L, Orefici G, Cirasola D, et al. Lack of evidence for reduced fitness of clinical *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):6068-9; reply 6072.
391. Lawler AJ, Ricci V, Busby SJW, Piddock LJ V. Genetic inactivation of *acrAB* or

- inhibition of efflux induces expression of *ramA*. J. Antimicrob. Chemother. 2013 Mar 14;
392. Angst DC, Hall AR. The cost of antibiotic resistance depends on evolutionary history in *Escherichia coli*. BMC Evol. Biol. 2013 Aug 2;13(1):163.
393. Tandukar M, Oh S, Tezel U, Konstantinidis KT, Pavlostathis SG. Long-Term Exposure to Benzalkonium Chloride Disinfectants Results in Change of Microbial Community Structure and Increased Antimicrobial Resistance. Environ. Sci. Technol. 2013 Aug 19;47(17):9730-8.
394. Bore E, Hébraud M, Chafsey I, Chambon C, Skjaeret C, Moen B, et al. Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. Microbiology. 2007 Apr;153(Pt 4):935-46.
395. Yu BJ, Kim JA, Ju HM, Choi S-K, Hwang SJ, Park S, et al. Genome-wide enrichment screening reveals multiple targets and resistance genes for triclosan in *Escherichia coli*. J. Microbiol. 2012 Oct;50(5):785-91.
396. Girgis HS, Liu Y, Ryu WS, Tavazoie S. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. PLoS Genet. 2007 Sep;3(9):1644-60.
397. Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, et al. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroregulative *Escherichia coli* Strain O42. PLoS One. 2010;5(1):e8801.
398. Xue J, Murrieta CM, Rule DC, Miller KW. Exogenous or L-rhamnose-derived 1,2-propanediol is metabolized via a pduD-dependent pathway in *Listeria innocua*. Appl. Environ. Microbiol. 2008 Nov 15;74(22):7073-9.
399. Sankar TS, Neelakanta G, Sangal V, Plum G, Achtman M, Schnetz K. Fate of the H-NS-repressed *bgl* operon in evolution of *Escherichia coli*. PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000405.
400. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, is an inositol phosphate phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998 Nov 24;95(24):14057-9.
401. Golubeva YA, Sadik AY, Ellermeier JR, Slauch JM. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. Genetics. 2012 Jan;190(1):79-90.
402. Phan T, Marquis R. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. Can J Microbiol. 2006;52(10):977-83.

Anexos

7.1. ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMP: Ampicilina
- ARN: Ácido ribonucleico
- BKC: Cloruro de benzalconio
- BLEE: β -lactamasa de espectro extendido
- BrEt: Bromuro de etidio
- CAZ: Ceftazidima
- CC: Complejo Clonal
- CCCP: Carbonil Cianida m-CloroFenilhidrazona
- CHX: Clorhexidina
- CIP: Ciprofloxacino
- CLO: Cloranfenicol
- CLSI: de las siglas en inglés de “Clinical and Laboratory Standard Institute”
- CMB: Concentración Mínima Bactericida
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- DHPS: DiHidroPterato Sintasa
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- ECOFF: punto de corte epidemiológico de las siglas en inglés de “Epidemiological Cut-OFF”
- ECP: Electroforesis de campo pulsado
- EPA: “US Environmental Protection Agency”
- ERI: Eritromicina
- ETH: Elemento de transferencia horizontal
- FDA: “Food and Drug Administration”
- GEN: Gentamicina
- IS: secuencia de inserción de las siglas en inglés de “Insertion Sequence”
- LB: Luria Bertani
- LPS: Lipopolisacárido
- MCS: de las siglas en inglés de “Multi-Cloning Site”
- MLST: de las siglas en inglés de “Multi-Locus Sequence Typing”
- NaOCl: Hipoclorito de sodio
- NCBI: de las siglas en inglés de “National Center for Biotechnology Information”
- O.N.: de las siglas en inglés de “Over Night”
- QAC: Compuesto de amonio cuaternario de las siglas en inglés de “Quaternary Ammonium Compound”

- SMR: de las siglas en inglés de “Small Multidrug Resistance”
- SNP: de las siglas en inglés de “Single Nucleotide Polimorphism”
- ST: Secuencia Tipo
- r.p.m.: Revoluciones por minuto
- TET: Tetraciclina
- Tn: Transposón
- TRI: Triclosan
- UCI: Unidad de cuidados intensivos

7.2. MAPA GENÉTICO DEL VECTOR DE CLONAJE pBGS18

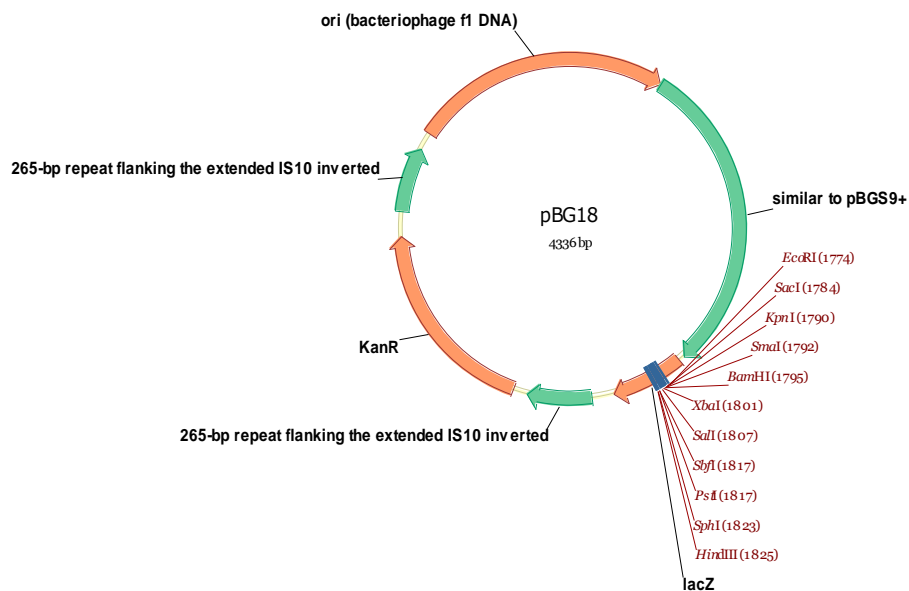


Figura 31. Mapa genético representativo del vector pBGS18 usado en los experimentos de clonación.

Los sitios de restricción indicados pertenecen al MCS.

7.3. PUBLICACIONES

a) Publicaciones directamente derivadas de esta tesis:

1. Curiao T, Cantón R, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, Baquero F, Coque T M. Association of composite IS26-*sul3* elements with highly transmissible IncI1 plasmids in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* clones from humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):2451-7.
2. Morrissey I, Oggioni M R, Knight D, Curiao T, Coque T M, Kalkanci A, Martinez J L and the BIOHYPO Consortium. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PlosOne*, Aceptado.
3. Curiao T, Coque T M, Marchi E, Viti C, Oggioni M R, Baquero F, Martinez J L, and the BIOHYPO consortium Selection of biocide-tolerant mutants among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* after pre-exposure to biocides or antibiotics. Enviado.
4. Curiao T, Marchi E, Viti C, Oggioni M R, Grandgirard D, Leib S L, Baquero F, Oggioni M R, Martinez J L, Coque T M. Common transcriptomic changes in the adaptation of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocides and antibiotics. Enviado.
5. Curiao T, Cantón R, Lira F, Martinez J L, Baquero F, Coque T M. Diversity of genetic platforms containing *sul2* genes among human clinical *Enterobacteriaceae* isolates (en preparación).

ii) Otras publicaciones obtenidas durante la realización de esta tesis:

1. Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M, Gijón D, Pintado V, Valverde A, Baquero F, Morosini MI, Coque TM, Cantón R. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Nov;68(11):2487-92.
2. Gijón D^a, Curiao T^a, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1558-63 ^a ambos autores contribuyeron de igual forma para el manuscrito.

3. Neves Andrade L, Costa Darini A L, **Curiao T**, Baquero F, Cantón R, Coque T M. Reply to “Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Brazilian Hospitals”, *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 August;56(8):4565.
4. Coque T M, Neves Andrade L, Costa Darini A L, **Curiao T**, Baquero F, Cantón R, Reply to “Expansion of Clonal Complex 258 KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program ” *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 March;56(3):1670-1671.
5. Andrade LN, **Curiao T**, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3579-83.
6. **Curiao T**, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Emergence of *bla* KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug;65(8):1608-14.
7. Diestra K, Juan C, **Curiao T**, Moyá B, Miró E, Oteo J, Coque TM, Pérez-Vázquez M, Campos J, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Spain. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jan;63(1):60-6.
8. Diestra K, Coque TM, Miró E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, Moyá B, **Curiao T**, Pérez-Vázquez M, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa. [Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 Aug-Sep;26(7):404-10. Erratum in: *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 Oct;28(8):575.

