



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

TESIS

**“CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA
TRANSFERENCIA DE LA MULTIRRESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* DE
ORIGEN ALIMENTARIO”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**CON OPCIÓN EN:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA
BIÓL.TANIA MELINA ANDRÉS REYES**

**ASESORA DE TESIS: CO-ASESOR DE TESIS:
D. C. ROSA DEL CARMEN D. C. YGNACIO MARTÍNEZ
ROCHA GRACIA LAGUNA**

PUEBLA, PUE.

ENERO 2015

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	4
AGRADECIMIENTOS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN	12
1. INOCUIDAD ALIMENTARIA Y PROBLEMÁTICA ACTUAL	12
2. BETALACTAMASAS EN ENTEROBACTERIAS	14
3. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES.....	16
3.1. Plásmidos	17
3.2. Integrones.....	19
3.3. Elementos transponibles	21
ANTECEDENTES.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS.....	28
ESQUEMA DE TRABAJO.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
1. MATERIAL BIOLÓGICO	30
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	31
3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA.....	31
3.1. Método de difusión por disco o antibiograma por Kirby-Bauer.....	31
3.2. Método de dilución en agar.....	33
3.3. Detección fenotípica de betalactamasas	34
4. EXTRACCIÓN DE ADN	35
4.1. Extracción de ADN total	35
4.2. Extracción de ADN plasmídico.....	35
4.3 TIPADO DE PLÁSMIDOS POR “PCR-BASED REPLICON TYPING” (PBRT).....	38
5. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	38
6. GELES.....	43
7. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	43
8. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES AMPLIFICADOS	44
9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	44
10. CONJUGACIÓN.....	45

RESULTADOS.....	48
1. PERFIL DE RESISTENCIA EN LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. coli</i> DE ORIGEN ALIMENTARIO.....	48
2. PERFIL PLASMÍDICO DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. coli</i> DE ORIGEN ALIMENTARIO.....	49
3. ENSAYOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA VÍA CONJUGACIÓN.....	50
A) EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN.....	51
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA.....	53
4.1. Determinación del perfil plasmídico de las transconjugantes.....	53
4.2. Determinación del perfil fenotípico de resistencia de las transconjugantes....	56
6. BÚSQUEDA MEDIANTE PCR Y SECUENCIACION DE INTEGRASAS Y GENES DE RESISTENCIA PARA DETERMINAR EL TIPO DE INTEGRÓN EN ALGUNAS CEPAS.	65
RESUMEN DE RESULTADOS.....	71
DISCUSIÓN.....	72
CONCLUSIONES.....	82
PERSPECTIVAS.....	83
REFERENCIAS.....	84
ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA	TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1		Integración de genes en integrones clase 1.	20
2		Elementos transponibles: Transposon simple y compuesto.	21
	1	Cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de productos cárnicos, multidrogosresistentes productoras de BLEES en Puebla, México.	30
	2	Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición para determinar el perfil de resistencia de las transconjugantes.	33
	3	Concentraciones de los antibióticos utilizados en cada placa para la realización de la CMI.	34
	4	Concentraciones de los reactivos utilizados para realizar las PCR multiplex y simplex para la determinación de los grupos de incompatibilidad.	37
	5	Reactivos y cantidades empleadas en las PCR.	37
	6	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a cloranfenicol y sulfonamidas.	38
	7	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a betalactamasas.	39
	8	Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.	40
	9	Primers utilizados para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica.	40,41,42
3		Placas controles utilizadas en los ensayos de conjugación.	44
4		Diluciones realizadas en los experimentos de conjugación.	45
5		Placas para seleccionar transconjugantes.	46
	10	Concentración Mínima Inhibitoria hacia CTX y CIP de las 6 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de alimentos cárnicos.	48
6		Perfil plasmídico de <i>E. coli</i> aisladas de alimentos cárnicos.	49
	11	Transconjugantes obtenidas en los experimentos de conjugación.	50

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	12	UFC obtenidas en los tres ensayos de conjugación de la cepa BUAP360 de <i>E. coli</i> para calcular la eficiencia de transferencia.	51
	13	Criterios de selección de cepas para caracterización de plásmidos involucrados en la transferencia de la resistencia.	52
	14	Pesos moleculares de la cepa control <i>E. coli</i> NCTC 50192.	53
	15	Cálculo estimado de los pesos moleculares de los plásmidos involucrados en la transferencia de la resistencia en las cepas de <i>E. coli</i> obtenidas de alimentos en estudio.	53
7		Perfil plasmídico de las cepas silvestres de <i>E. coli</i> obtenidas de alimentos y transconjugantes	54
	16	Determinación del perfil fenotípico de resistencia de las cepas silvestres de <i>E. coli</i> de origen alimentario y sus transconjugantes mediante el método de Kirby Bauer.	55
8		Amplificación del gen <i>bla</i> _{CTX-M-1} .	56
9		Amplificación del gen <i>bla</i> _{TEM}	56
10		Amplificación del gen <i>bla</i> _{CMY-2} .	57
	17	Genes <i>bla</i> detectados en las cepas silvestres de <i>E. coli</i> aisladas de alimentos y sus transconjugantes.	57
	18	Reacciones de PCR realizadas para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica.	58
11		Múltiplex 1 y 2.	59
12		Múltiplex 3 y 4.	60
13		Simplex 11	60
14		Simplex 6-IncFD.	61
	19	Grupos de incompatibilidad plasmídica detectados en las cepas de <i>E. coli</i> de origen alimentario y sus transconjugantes.	61
15		Ingreso de la secuencia del grupo de incompatibilidad a http://pubmlst.org/plasmid/	62
16		Alineamiento local en la base de datos GenomeNet	63
17		Información obtenida con el alineamiento local en GenomeNet.	63
18		Amplificación del gen <i>int1</i> a las cepas de <i>E. coli</i> aisladas de productos cárnicos.	65
19		Amplificación del gen <i>qac</i> .	66
20		Amplificación del gen <i>sul1</i> .	66

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

21		Amplificación del gen <i>tetA</i> .	67
22		Amplificación del gen <i>tetB</i> .	67
23		Amplificación del gen <i>cmlA</i> .	68
24		Amplificación del gen <i>sul3</i> .	68
	20	Integrasas y genes de resistencia en cepas de <i>E. coli</i> de origen alimentario	69
25		Amplificación de la región variable de integrones clase 1.	69
	21	Resumen de resultados obtenidos en las cepas de <i>E. coli</i> y sus transconjugantes.	70

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia, por haberme adoptado a mitad del camino y haber puesto toda su confianza en mí, por haberme tenido tanta paciencia y por su amabilidad al responder cada duda. ¡Muchísimas gracias!

A mi co-asesor de tesis D. C. Ygnacio Martínez Laguna, porque desde el principio tuve su guía, apoyo, consejos (académicos y no académicos), motivación y su disponibilidad en todo momento para orientarme y “enderezar” el camino cuando se requirió. ¡Mil gracias por todo a mi papá poblano-tabasqueño!

A la D. C. Patricia Lozano Zarán por exprimirme tantas veces el cerebro y estar al pendiente de mi trabajo siempre que lo requería.

Al D. C. Ricardo Carreño López por todo el apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al D. C. Alberto Ramírez Mata por sus asesorías y consejos en la revisión de esta tesis.

¡A mi hermosa familia! A mis papás Julia y Benjamín porque gracias a ustedes estoy aquí concluyendo esta etapa. Este logro es de ustedes también, ya que gracias a todos los cimientos y valores que pusieron en mí desde niña y a su guía y amor incondicional lo he logrado: ¡los amo con todo mi corazón! Y por supuesto, también a mis hermanos Víctor Hugo, Julia Venus y Ramsés porque siempre estuvieron dándome ánimos y al pendiente de mí. ¡Ram! Tú que estuviste a menos distancia en kilómetros gracias por darme tanta fuerza y motivación cuando más lo necesite, esas escapadas que me di al DF para refugiarme contigo y esas llamadas al finalizar el día fueron de muchísima ayuda hermanito, ¡te amo bro! Eres un ejemplo de fortaleza y lucha constante mi twin.

A mis compañeros de laboratorio: Andrea, tu amistad y sinceridad las valoro enormemente, mil gracias por escucharme siempre y animarme en los momentos difíciles, eres un ejemplo de trabajo, constancia y perseverancia (sobre todo si trabajas con *Haemophilus*). También agradezco a Elena por sus consejos y hasta jalones de oreja ¡gracias por escucharme, acompañarme y apoyarme en momentos en los que no me soportaba ni yo misma! A Don postdoc

AGRADECIMIENTOS

Alejandro 'Carabarini' que siempre estuvo aconsejándome sabia y oportunamente en el laboratorio con gran disposición, gracias por compartirme un poco de tus conocimientos cuando lo requerí y por hacerme reír tantas veces. A Migue "el peque" de la Dra. Paty, jamás olvidaré los buenos momentos y todas las risas a tu lado. A Enrique (Kike) por tantos momentos divertidos en el laboratorio y también en la vagancia. Te agradezco también Caro por apoyarme siempre que fue necesario en el laboratorio, por tus pláticas de moda, comida y hasta Feng Shui. Y por último, pero no menos importante, a Gerardo que me orientó muy bien desde el primer día que llegué, gracias por responder mis dudas y ayudarme con varias técnicas que usé durante mi estancia en el lab, y claro, siempre con tu peculiar manera de explicarme y hasta por hecharme carrilla cada que se te ocurría.

¡Siempre los recordaré así como también a los épicos y memorables festejos de cumpleaños de cada uno de ustedes!

Debo de agradecer también a mis compañeros de generación que me acompañaron durante estos dos años y medio: Jessie, como olvidar que me ayudaste tantas veces a estudiar biología molecular aunque te desesperara con mis ocurrencias, eres un ejemplo de amistad incondicional, inteligencia y trabajo constante, ¡muchas gracias!; Arthur, gracias por escucharme, aconsejarme y tantas risas juntos, eres un guerrero; Arturo "Malagón" jamás olvidaré todos los momentos de ocurrencias en las clases y cuando íbamos a desayunar a echar el chisme, gracias por tu amistad my friend. Y a Lilia y Cruza por compartir conmigo tantas noches de party y de vagancia, ¡inolvidables! Gracias chicas.

A mis hermanos ortodoncistas Roberto, Chivis, Liz y Anais ¡mil gracias por tanto! Fueron mi mayor apoyo estos últimos meses, ¡son un tesoro mis chiquitos! Me llevo más que su amistad, ¡los adoro!

Además, debo agradecer a todos (as) mis amigos (as) que aunque estuvieron lejos en la distancia, siempre han estado presentes con llamadas o mensajes.

¡GRACIAS POR TODO!

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
AmpCp	Betalactamasa tipo AmpC plasmídica
ATM	Aztreonam
BLEE	Betalactamasa de espectro extendido
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grado centígrado
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CC	Complejo clonal
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CS	Conserved Segment (Segmento conservado)
CTX	Cefotaxima
dNTPs	Desoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético sal disódica
FEP	Cefepime
FOX	Cefoxitina
g	Gramo
H	Hora
I	Sensibilidad intermedia
IMP	Imipenem
Inc	Grupo de incompatibilidad
IS	Insertion Sequence (Secuencia de inserción)
Kb	Kilobase
L	Litro
LB	Luria-Bertani
µg	Microgramo
µl	Microlitro

ABREVIATURAS

M	Molar
MBL	Metalobetalactamasa
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MH	Müller Hinton
min	Minuto
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	Milimolar
mm	Milímetro
m/v	Relación masa/volumen
NA	Ácido nalidíxico
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBRT	PCR-based replicon typing (Tipado de replicon basado en PCR)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos)
R	Resistente
RI	Integrones de resistencia
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
Seg	Segundo
ST	Sequence Type (Secuencia tipo)
S	Estreptomicina
SUL	Sulfonamidas
SXT	Trimetoprim/sulfametoxazol
Tc	Transconjugante
TE	Tetraciclina
Tn	Transposón
Tnp	Transposasa
UFC	Unidades formadoras de colonias
vol/vol	Relación volumen/volumen

RESUMEN

Para realizar la caracterización molecular parcial de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos, a partir de un estudio anterior se obtuvieron 59 cepas aisladas de carne de cerdo y de pollo en diferentes mercados y supermercados de la ciudad de Puebla. Dichos aislados se sembraron en placas de agar Levine suplementado con cefotaxima a una concentración de 2 µg/ml. Se recuperaron 33 cepas de *Escherichia coli* potencialmente resistentes a antibióticos betalactámicos y posteriormente se les detectó el fenotipo BLEE a 17 de las mismas. De esta pre-selección se eligieron siete cepas con base en su resistotipo para describir el mecanismo de transferencia génica utilizado por éstas, en este estudio. A los siete aislados que presentaron fenotipo multirresistente se les detectaron genes que les conferían resistencia a diferentes antimicrobianos, incluidos genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CMY-2} y genes asociados con integrones clase 1 *int1*, *qac*, *sul*, *cmlA*, *sul3*, *tetA*, *tetB*, mismos que fueron detectados y confirmados en seis de los siete aislados y sus transconjugantes. La transferencia de la multirresistencia a antibióticos fue mediada por plásmidos de entre 53 y hasta 200 kb, del grupo de incompatibilidad F (IncF) en las cepas BUAP253, BUAP360, BUAP382, BUAP402, BUAP433 Y BUAP442, transfiriendo múltiples genes de resistencia a antimicrobianos contenidos en integrones clase 1; también se detectaron plásmidos IncN en las cepas BUAP253, BUAP433 y BUAP442 productoras de CTX-M-1, CTX-M-15 y CTX-M-2, así como un plásmido IncI1 en la cepa BUAP402. Plásmidos del grupo de incompatibilidad InccolE fueron detectados en las cepas BUAP402, BUAP433 y BUAP442 productoras de CMY-2 y TEM1b, mientras que el grupo InccolE_{TP} fue detectado en plásmidos de las cepas BUAP433 y BUAP442.

Este es el primer estudio en México en el que se demuestra la presencia de genes de betalactamasas portados en plásmidos conjugativos en cepas de *E. coli* de origen alimentario; hecho que provee evidencia para reconocer a los animales de consumo humano como portadores de estos microorganismos y su posible papel como reservorios en la diseminación de cepas que almacenan genes de multirresistencia, transmisibles mediante plásmidos. **Palabras clave:** alimentos de origen animal; plásmido; grupo de incompatibilidad.

INTRODUCCIÓN

1. INOCUIDAD ALIMENTARIA Y PROBLEMÁTICA ACTUAL

La inocuidad alimentaria es la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor. Sin embargo, la presencia de contaminantes en ellos ha representado un problema de salud para el ser humano desde los inicios de la historia (WHO, 2012).

Un alimento se considera contaminado cuando contiene agentes biológicos tales como microorganismos o parásitos riesgosos para la salud, sustancias químicas tóxicas como pesticidas, insecticidas y fertilizantes en concentraciones mayores a las permitidas o bien, contaminantes físicos tales como restos de vidrio, madera o metal (PAHO, 2012).

Dentro de los problemas actuales en materia de contaminación alimentaria destacan las enfermedades ocasionadas por bacterias aisladas de animales destinados para consumo humano y sus productos derivados que pudieron contaminarse durante su manipulación en mercados y mataderos (WHO, 2007; FAO 2013).

Además, la creciente demanda de alimentos, su procesado y comercialización a gran escala amplifica de muchas maneras los riesgos sanitarios, ya que tanto el hacinamiento de gran densidad de animales, como las malas prácticas de higiene laboral, favorecen la aparición de brotes epidémicos. Aunado a esto, las malas prácticas asociadas con la crianza masiva de animales tales como el uso de pequeñas dosis de antibióticos y otros compuestos farmacéuticos con el objetivo de incrementar la productividad y reducir costos, traen como consecuencia la selección de bacterias multirresistentes a antibióticos. Debido a lo anterior, el aumento en la aparición de cepas causantes de enfermedades por bacterias antes consideradas como comensales, ha sido cada vez más frecuente (Rocha-Gracia, *et al.*, 2009).

De hecho, en los últimos años, se ha incrementado la prevalencia de enterobacterias multirresistentes a antibióticos tales como *E. coli*, productoras de BLEE/AmpCp aisladas de animales para consumo humano, lo que provee evidencia para reconocer a estos animales como reservorios de microorganismos multirresistentes a antibióticos y su posible papel como reservorios en la diseminación de cepas que poseen genes de resistencia transmisibles vía plásmidos (Liebana, *et al.* 2013).

Escherichia coli es un microorganismo muy diverso. Es un comensal que habita en el intestino humano y normalmente no causa ningún daño. Sin embargo, solo necesita la adecuada combinación de elementos genéticos móviles para convertirse en un patógeno altamente adaptado capaz de causar un amplio rango de enfermedades que van desde gastroenteritis hasta infecciones extraintestinales en el tracto urinario, torrente sanguíneo y en el sistema nervioso central (Croxen y Finlay, 2010).

La pérdida y ganancia de estos elementos genéticos móviles tiene un rol esencial en la conformación del genoma de las bacterias patógenas, éstos pueden transmitirse mediante transferencia horizontal de genes (HTG), el cual es el mecanismo más importante que disemina rápidamente nuevas características al genoma de los organismos, por lo tanto, la adquisición de estos elementos es crucial en la supervivencia y adaptación del patógeno ya que muchos de los genes de virulencia y de resistencia a antimicrobianos que están presentes en *E. coli*, se encuentran dentro de islas de patogenicidad y en plásmidos (Croxen y Finlay, *op cit*), y pueden transferirlos a otras bacterias mediante el mecanismo anteriormente descrito.

Es por ello que la emergencia de organismos resistentes a varios antibióticos es una preocupación de Salud Pública, debido a que son capaces de causar infecciones severas y amenazadoras de la vida ya que son difíciles de tratar debido a que las opciones de tratamientos son limitadas (Lozano-Zarain, 2009), esto hace necesaria una intervención para garantizar que nadie enferme a causa de los alimentos y que la implementación de medidas sanitarias regulatorias en

el sistema alimentario a gran escala sean un punto de importancia mundial (Liebana, *et al.*, 2013, FAO 2013).

2. BETALACTAMASAS EN ENTEROBACTERIAS

El principal mecanismo de resistencia hacia los antibióticos betalactámicos consiste en la producción de enzimas betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico y que por tanto, inactivan el antibiótico antes de su unión a las PBPs (Suárez *et al.*, 2009). Las betalactamasas se han clasificado, esencialmente, en función de su estructura molecular (clasificación de Ambler) y de sus características enzimáticas (clasificación según Bush, Jacoby y Medeiros). La clasificación molecular de Ambler divide a las betalactamasas en cuatro clases (A, B, C y D), basándose en la estructura de la proteína. Las enzimas de los grupos A, C y D son serin-betalactamasas, que contienen una serina en su centro activo, y las del grupo B son metalo-betalactamasas, dependientes de Zn^{2+} (Ambler *et al.*, 1980).

La clasificación funcional propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 y actualizada en 2010 (Bush *et al.*, 1995; Bush *et al.*, 2010) establece diferentes grupos, según su sustrato y el perfil de inhibición por inhibidores de betalactamasas:

1. El grupo 1 incluye enzimas de la clase C de Ambler que hidrolizan cefalosporinas y no son inhibidas por el ácido clavulánico o tazobactam.
2. El grupo 2 incluye enzimas de las clases A y D de Ambler, de las cuales la mayoría se inhiben por el ácido clavulánico. Estas enzimas se subdividen en 12 subgrupos.
3. El grupo 3 incluye enzimas de la clase B de Ambler. Son metalobetalactamasas cuya actividad requiere la unión de Zn^{2+} al centro activo y se inhiben por agentes quelantes como el EDTA, pero no por el ácido clavulánico o por tazobactam.
4. El grupo 4 agrupa enzimas no inhibidas por el ácido clavulánico y que no se incluyen en las otras categorías.

Dentro de las betalactamasas, cabe destacar a las betalactamasas de espectro extendido que confieren resistencia a una amplia gama de betalactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación y monobactámicos, siendo las más frecuentemente distribuidas entre las enterobacterias aquellas que pertenecen a las familias TEM, SHV y CTX-M (Liebana, *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha propuesto una clasificación para facilitar el control epidemiológico de las BLEE. Se establecen así tres grupos: BLEE_A, BLEE_M y BLEE_{CARBA} con diferentes subclases cada uno, de acuerdo con sus características fenotípicas. El grupo BLEE_A agrupa a las betalactamasas de clase 2be, donde se encuentran las BLEE más prevalentes (TEM, SHV y CTX-M). El grupo BLEE_M engloba, entre otras, a las AmpC plasmídicas y las BLEE tipo OXA. El grupo BLEE_{CARBA} está compuesto por carbapenemasas, incluyendo las metalobetalactamasas y serin-betalactamasas con actividad hidrolítica frente a carbapenémicos (Giske *et al.*, 2009).

La resistencia a betalactámicos, especialmente a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (considerados como antimicrobianos altamente importantes por la WHO) en enterobacterias, es producida por BLEEs. Dentro de estas enterobacterias destaca *Escherichia coli* y a su vez, dentro de las BLEEs más comunes producidas por esta bacteria, destacan aquellas del tipo CTX-M, cuya presencia ha incrementado rápidamente durante los últimos 10 años en todo el mundo y lo cual ha sido considerado como un grave problema para la salud (Valentin *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2013).

Los genes de BLEEs dentro de la familia *Enterobacteriaceae* son diseminados por plásmidos, secuencias de inserción y transposones, algunos de los cuales son homólogos en bacterias encontradas en animales destinados para consumo humano, sus derivados y humanos (Liebana, *et al.*, 2013). Precisamente, el éxito en la diseminación de cepas productoras de BLEEs radica en la transferencia de genes *bla* mediante este tipo de elementos genéticos móviles, pero al mismo tiempo, dificulta la identificación de rutas de transmisión y de las fuentes de estas bacterias productoras de BLEEs (Valentin *et al.*, 2014).

La presencia de enterobacterias productoras de BLEE ha sido reportada en una gran diversidad de ambientes (granjas, aguas residuales, muestras ambientales), en animales (de crianza y domésticos) y dentro de la población en general, desde pacientes hospitalizados hasta en humanos sanos dedicados a la crianza de animales tales como pollos, cerdos y ganado vacuno (Moodley y Guardabassi, 2009; Hammerum *et al.*, 2014 Valentin *et al.*, 2014).

2.1. Betalactamasas de tipo AmpC

Las betalactamasas de tipo AmpC son cefalosporinasas intrínsecas encontradas en el cromosoma de muchas bacterias Gram-negativas. Estas enzimas, además de conferir resistencia a los mismos antibióticos que las BLEE también confieren resistencia a las combinaciones de betalactámico con inhibidor y a cefamicinas, no así a cefalosporinas de cuarta generación ni carbapenémicos. Sin embargo, un gran número de enzimas AmpC han sido ahora detectados en plásmidos, denominándose AmpC plasmídicas, las cuales caen en seis grupos filogenéticos, siendo CMY-2 la más común (Liebana, 2013).

La prevalencia de betalactamasas de tipo AmpC codificadas en plásmidos (AmpCp) ha incrementado tanto en animales de crianza como en humanos en todo el mundo, este año se han aislado bacterias como *E. coli* y *Salmonella* productoras de AmpCp de carnes y otros productos derivados de animales, aumentando la incidencia de infecciones humanas producidas por estas bacterias por el consumo de carne mal cocida, leche cruda y contaminación cruzada en norte américa (Guo, Y. F. *et al*, 2014).

3. ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

Aunque las bacterias pueden transferir genes de manera vertical o reproductiva de una célula madre a una célula hija de manera similar a como lo hacen otros organismos, éstas también pueden intercambiar ciertos genes de manera horizontal. Estos genes se pueden mover dentro y entre genomas en porcentajes elevados debido a los elementos genéticos móviles (Carattoli, 2009). Dentro de

estos elementos se agrupan los transposones, plásmidos e integrones móviles. La transferencia horizontal de genes de resistencia es un mecanismo exitoso para la transmisión y diseminación de la multirresistencia entre bacterias patógenas (Rankin, *et al.*, 2011).

3.1. Plásmidos

Las bacterias cargan elementos extracromosomales, autorreplicativos llamados plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN de doble cadena, circular y capaces de replicarse de manera autónoma en una célula bacteriana y aunque se suelen considerar como material genético dispensable, un número importante de plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a las células que los portan, confiriéndoles algún tipo de ventaja evolutiva a través de una relación simbiótica. Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a antibióticos, o metales pesados, y producción de bacteriocinas. Muchos plásmidos codifican sistemas de adicción los cuales son capaces de asegurar la permanencia de los mismos durante el proceso de división celular en las células hijas (Bennet *et al.*, 2008; Carattoli 2009; Lorenzo-Díaz, 2010). Se han caracterizado dos tipos de mecanismos que aseguran la conservación de los plásmidos que los portan. Por un lado, los genes regulados por ARNs antisentido codificantes de proteínas que destruyen las bacterias que no han adquirido el plásmido, dañando su membrana celular como lo son los sistemas Hok-sok y PndA-PndC, y por otro lado, están los sistemas regulados por proteínas antitoxina como son los sistemas PemK-PemI y RelB-RelE. Ambos tipos de mecanismos de conservación de plásmidos son similares. Las células hijas heredan en el proceso de división celular ciertas cantidades tanto de toxina como de antitoxina o ARN antisentido. Los reguladores antagónicos que neutralizan las toxinas son metabólicamente inestables, de modo que se degradan rápidamente en las células hijas que no han heredado los plásmidos. Puesto que las células también han heredado las toxinas, que sí son estables, no podrán ser neutralizadas y las células hijas que carezcan del plásmido acabarán muriendo. Finalmente, estos mecanismos evitan la proliferación de bacterias que hayan perdido los plásmidos que los codifican. En consecuencia los plásmidos se estabilizan y persisten (Ruiz, 2012).

3.1.1. Clasificación

La identificación y clasificación de los plásmidos debería ser basada en características genéticas que fueran constantes y que tuvieran que ver con el mantenimiento de los plásmidos en la célula, como los controles de replicación. Sin embargo, los plásmidos se han clasificado según diversos criterios, como por ejemplo el número de copias, el rango de hospedador y su capacidad de transferencia entre células, es decir si son plásmidos conjugativos o plásmidos movilizables (Carattoli, 2009).

3.1.2. Plásmidos conjugativos y movilizables

Los plásmidos conjugativos contienen genes que codifican proteínas que permiten su transferencia desde las bacterias que poseen estos plásmidos a otras bacterias que carecen de ellos, mientras que los plásmidos movilizables carecen de genes para la conjugación pero pueden aprovechar la maquinaria puesta en marcha por un plásmido conjugativo del mismo microorganismo donante para diseminarse a una cepa receptora (Couturier *et al.*, 1998; Martínez-Martínez *et al.*, 2010).

3.1.3. Grupos de incompatibilidad

Una propiedad que es inherente de los plásmidos y que es muy útil para su clasificación es la incompatibilidad, la cual es la incapacidad de dos plásmidos para ser propagados en la misma clona debido a que comparten los mismos controles para la replicación, mientras que dos plásmidos serán compatibles y capaces de permanecer en la misma célula debido a que sus controles de replicación son diferentes, (Carattoli, 2005; Couturier, *et al.*, 1988). En 1971, Hedges y Datta propusieron una clasificación plasmídica basado precisamente en la incompatibilidad plasmídica. Posteriormente, en 1988, Couturier y colaboradores propusieron un método de tipificación plasmídico basado en hibridación por Southern Blot utilizando los replicones de los plásmidos, sin embargo, la baja especificidad del método llevó a que en 2005, debido al incremento en la prevalencia de bacterias multirresistentes cuyos genes de resistencia eran transferidos por plásmidos, Carattoli *et al.*, propusieran un

método para identificar los principales grupos de incompatibilidad en enterobacterias (IncHI1 IncHI2, IncI1, IncX, IncL/M, IncN, IncFIA, IncFIB, IncW, IncY, IncP, IncFIC, IncA/C, IncT, IncFIIS, IncFrepB, IncK, IncB/O, IncFIBs, IncFIIs, IncFII, IncFD, IncFIly, IncFIIk, IncR, IncU, oricoIE, oricoLETp) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al que denominaron “inc/rep PCR-based replicon typing (PBRT)” y posteriormente, García-Fernández en 2009 y Villa en 2010 ampliaron el número de cebadores para abarcar un mayor número de replicones, y así darle seguimiento a la evolución y diseminación de plásmidos emergentes (Carattoli *et al.*, 2005; García-Fernández, *et al.*, 2009; Villa, *et al.*, 2010).

Algunos plásmidos, como los de grupo de incompatibilidad F cargan más de un tipo de replicón, esto se conoce como estado de “multirreplicón”, lo que significa que su rango de hospedero se amplía debido a que más de un replicón puede iniciar la replicación, permitiendo de esta manera la captación de nuevos plásmidos con el mismo tipo de replicón y sobrepasando así la barrera de la incompatibilidad. En estos casos, los replicones que no participan en la replicación, son capaces de sufrir unas pocas mutaciones y de generar de esta manera nuevas variantes compatibles con los nuevos plásmidos para evadir la incompatibilidad (Villa, 2010).

3.2. Integrones

Los integrones son estructuras genéticas capaces de adquirir y transferir genes de resistencia en bloques y pueden estar localizados en el cromosoma de una bacteria o en plásmidos. La diseminación de genes de resistencia entre diferentes replicones y su intercambio entre plásmidos y cromosoma bacteriano se facilitan por la incorporación de integrones en elementos transponibles. La alta eficiencia en la captura génica y en la expresión génica junto con la capacidad de transferencia horizontal y vertical de los genes de resistencia representa una estrategia poderosa usada por las bacterias para contrarrestar el uso de antimicrobianos (Carattoli, 2001).

El mecanismo de captación de genes por los integrones (Fig. 1) consiste en un sistema de recombinación sitio-específica. En su forma más sencilla, los

integrones están formados por 3 elementos necesarios para la captura y expresión de los genes:

1. un gen que codifica una enzima integrasa (*intl1*).
2. un lugar de recombinación sitio-específica (*attI*), donde se produce la integración de los genes cassette.
3. un promotor para la expresión de los genes cassette integrados. A veces presentan un segundo promotor más fuerte, localizado adyacentemente en posición 3' respecto del primero, que incrementa el grado de transcripción y expresión de los genes (Ruiz, 2012).

De acuerdo al tipo de integrasa que posean, se han descrito varias clases de integrones, pero los más frecuentes son los de clase 1 (Mazel, 2006). Los componentes usuales de este tipo de integrones incluyen el gen de la integrasa clase 1 *intl1* en el extremo 5'CS y los genes *qacA1* y *sul1* en el extremo 3'CS que confieren resistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas respectivamente. Sin embargo, se han reportado integrones de clase 1 no clásicos sin los genes *qacA1* y *sul1* que han sido muy asociados con la presencia de otros genes tales como *cmlA* y *sul3*.

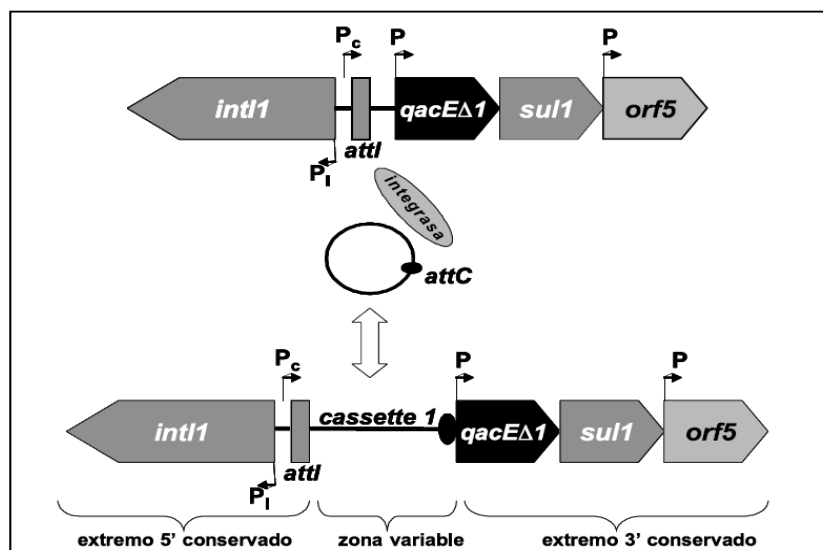


Fig. 1. Integración de genes en integrones clase 1.

El incremento en el número de reportes de este tipo de elementos genéticos ha incrementado enormemente en los últimos años gracias a su movilización mediante plásmidos, aunado a esto, la alta eficiencia que poseen para adquirir nuevos y diversos genes de resistencia, los convierte en uno de los mecanismos más importantes en la diseminación de la resistencia a antimicrobianos. (Carattoli, 2001; Marchant, Vinué, Torres, & Moreno, 2013; Sáenz et al., 2010; Sarria-Guzmán et al., 2014; Soufi et al., 2011).

3.3. Elementos transponibles

Estos elementos, tienen la capacidad de moverse tanto intra como intermolecularmente; es decir, pueden saltar dentro de una misma molécula de ADN, o de una molécula a otra. Este cambio de localización puede tener lugar entre dos plásmidos o entre un plásmido y el cromosoma bacteriano. Generalmente, estos mecanismos no requieren homología entre el elemento transponible y el sitio de inserción, pudiendo insertarse aleatoriamente en el genoma. No obstante, hay elementos que presentan una fuerte tendencia a insertarse en determinadas secuencia nucleotídicas (Wagner, 2006).

Los elementos transponibles aportan una gran plasticidad al genoma de la bacteria que los posee y pueden ser de tres tipos: a) Secuencias de inserción (IS), b) Transposones y c) Transposones conjugativos o elementos ISCR. Cada uno de estos elementos de DNA contiene un gen que codifica una transposasa, una enzima que conduce las reacciones de ruptura y unión de DNA, necesarios para que el elemento se mueva. Cada elemento móvil también porta secuencias cortas de DNA (rojo) necesarias para la translocación y que son reconocidas por la transposasa codificada por el mismo elemento (Fig. 2) (Griffiths *et al.*, 2000).

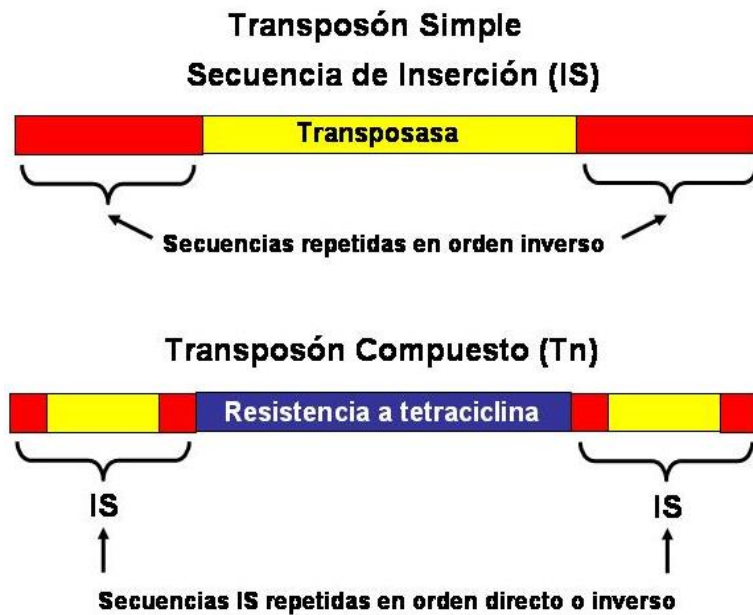


Fig. 2. Elementos transponibles: Transposon simple y compuesto.

Las IS se encuentran distribuidas por el genoma en localizaciones y número variables según especies y cepas. Están implicadas en deleciones, inversiones o reorganizaciones del genoma bacteriano que tienen un gran efecto en su ensamblaje y en la agrupación de genes con funciones adaptativas como resistencia a antibióticos, virulencia o funciones catabólicas (Bennet, 2004; Haren *et al.*, 1999). Por otro lado, los transposones son los principales elementos transponibles capaces de transportar otros genes adicionales a los necesarios para la transposición. Su tamaño varía de 2 a 50 kb. Están formados por una IS en cada extremo y una secuencia de ADN central que puede albergar multitud de genes capaces de modificar el fenotipo bacteriano, como es el caso de los genes de resistencia. Los transposones están flanqueados por dos IS iguales cuyas repeticiones en los extremos pueden estar invertidas o no, permitiendo su transposición a diferentes localizaciones.

ANTECEDENTES

El estudio de la transferencia de la multirresistencia a antibióticos en cepas de origen clínico ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, en años recientes, ha incrementado el interés de la comunidad científica para estudiar esta transferencia en cepas aisladas de animales y alimentos ya que diversos estudios han alarmado sobre la aparición de cepas multirresistentes en este tipo de aislados y que pueden transferirse a humanos susceptibles.

A continuación se muestran algunos de los trabajos más relevantes sobre de la transferencia de la multirresistencia en este tipo de aislados, realizados en años recientes:

En China, Guo *et al.* reportaron la presencia de cepas de *E. coli* multirresistentes aisladas de cerdos y pollos productoras de betalactamasas del tipo AmpCp tales como CMY-2. Estas cepas, eran portadoras de otros genes que les conferían resistencia a otros antimicrobianos, dichos genes de resistencia detectados se encontraban dentro de plásmidos de los grupos de incompatibilidad Inc A/C, Inc K/B e IncF y sus pesos moleculares eran de 160 a 200 kb. Además observaron que estos plásmidos eran fácilmente transferidos vía conjugación y que albergaban a su vez integrones de clase 1 portadores de genes que les conferían resistencia a otra diversidad de antibióticos (Guo *et al.*, 2014).

En Dinamarca, Hammerum y colaboradores compararon y caracterizaron cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEEs obtenidas de cerdos, granjeros al cuidado de estos animales y sus familias en granjas con uso previo o no de cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Los autores detectaron 79% de cepas BLEE positivas en las granjas que usaban cefalosporinas, en comparación con un 20% de cerdos en las granjas que no las usaban. Dentro de los genes que encontraron tanto en humanos como en cerdos fueron *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M14} y *bla*_{SHV-12} y observaron que la mayoría de los plásmidos con el gen *bla*_{CTX-M-1} se transmitían por conjugación y pertenecían a los grupos de incompatibilidad

Incl1, IncF o IncN, lo que indica la transferencia de estas cepas multirresistentes entre cerdos y granjeros (Hammerum *et al.*, 2014).

En Irlanda Wang *et al.*, caracterizaron plásmidos de *E. coli* BLEE positivas obtenidas de humanos sanos y animales de crianza para consumo humano y observaron la transferencia de la resistencia a cefotaxima mediante experimentos de conjugación. Catorce de dieciséis plásmidos fueron secuenciados y sus tamaños variaron entre 1.8 y 166.6 kb.

Dentro de los grupos de incompatibilidad detectados estuvieron Incl1/ST3, Incl1/ST36, IncN/ST1, IncF e Inc B/O. Estos datos resaltan la exitosa diseminación de genes BLEE mediados por plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad entre humanos y animales productores de alimentos (Wang *et al.*, 2014).

Por otro lado, en España, Ruiz-Ruiz en 2012, reportó la presencia de aislados multirresistentes de *E. coli* de diferentes ambientes entre los cuales incluyó alimentos, que también transferían fácilmente genes de resistencia a otras cepas vía conjugación. Observó la presencia de plásmidos del grupo de incompatibilidad F predominantemente y también detectó la presencia de integrones clase 1 y 2 presentes dentro en estos plásmidos.

En Túnez Ben Sallem y colaboradores detectaron la presencia de genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CMY-2} en cepas de *E. coli* obtenidas de humanos sanos, mascotas y animales destinados a consumo humano en plásmidos de grupos de incompatibilidad Incl1 y en muchos casos se detectó la presencia de otros replicones como IncF, InccolE e IncN, siendo la mayoría de estos transferidos por conjugación (Ben Sallem *et al.*, 2014).

En Japón del 2011, Hiroi y colaboradores reportaron la presencia de genes BLEE en cepas de *E. coli* aisladas de animales que son fuente de alimentos (pollos, cerdos y reses) tales como *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-44}, cuyos pesos moleculares fueron determinados con enzimas de restricción. En ese mismo país, Shiraki *et al.*, 2004 reportaron la presencia de *E. coli* productoras de CTX-M-2 en ganado vacuno, mientras que la Japanese

Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program (JVARM) reportó el aislamiento de *E. coli* productoras de BLEEs en aves de corral, apoyando el hecho de que las bacterias comensales y ambientales encontradas en granjas pueden estar actuando como reservorios para la transferencia de genes de resistencia a bacterias patógenas (Kojima *et al.*, 2005).

En 2010, en Italia, Villa *et al.*, caracterizaron y subclasificaron plásmidos del grupo de incompatibilidad F en cepas de alimentos y otros ambientes en enterobacterias, ya que dichos plásmidos están muy asociados con la presencia de BLEES del tipo CTX-M el cual es un marcador molecular de resistencia en todo el mundo y reconocieron la importancia de subcategorizarlos debido a que puede ser de gran utilidad para conocer la distribución de este tipo de plásmidos y por consiguiente la diseminación de genes de resistencia como CTX-M, CMY, OXA entre otros.

Asimismo, en Túnez se analizaron aislados de alimentos de diferentes supermercados y carnicerías donde detectaron la presencia de *E. coli* multirresistentes productoras de betalactamasas (CTX-M y CMY) y de integrones que les conferían a estas cepas no solo resistencia a antibióticos betalactámicos, sino también a otros antibióticos no betalactámicos como aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas (Ben Slama K. B. *et al.* 2010).

En México, en el Instituto Nacional de Salud Pública los doctores Silva-Sánchez y Garza-Ramos han trabajado en el estudio de la transferencia de la multirresistencia a antibióticos con cepas de origen clínico de diferentes zonas del país pero no con cepas aisladas de alimentos. Ellos han reportado la transferencia de genes de resistencia mediante plásmidos de grupos de incompatibilidad IncFIIIs, IncFrep, IncFIB, IncL/M, IncHI1 mayores a 90 y de hasta 260 kb usando como marcador de peso molecular la cepa de *E. coli* NCTC 50192 usada previamente por Philippon *et al.*, 1997 en Francia (Philippon *et al.*, 1997; Silva-Sánchez *et al.*, 2013).

En nuestro laboratorio, Rocha-Gracia en 2010 identificó un plásmido de grupo de incompatibilidad IncF de 145 kb en una cepa de *E. coli* de origen intrahospitalario que almacenaba genes de resistencia a betalactámicos tales como los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{TEM-1}, a quinolonas (*qepA*) y a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib-cr*) (Rocha-Gracia *et al.*, 2010).

Sin embargo, la información que se tiene al respecto de la transferencia de la multirresistencia a antibióticos en cepas de origen alimentario no ha sido documentada hasta el momento en México, lo que ha ocasionado rezago en la implementación de programas de control y prevención en comparación con otros países, por lo que este trabajo tiene como finalidad dar un panorama general sobre la situación de la multidrogorresistencia encontrada en cepas aisladas de alimentos e incrementar la realización de estudios con este tipo de cepas debido a que es un problema alarmante en cuestión de Salud Pública por el posible incremento en la aparición de infecciones con cepas multirresistentes de origen alimentario.

Los reportes anteriores, representan ejemplos de la emergencia y amplia diseminación de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de manera paralela en el ámbito humano, animal y otras fuentes como alimentos, gracias a la inclusión de los genes codificantes de estas enzimas en plásmidos con alta capacidad de diseminación en muy diversos clones de *E. coli*, que por lo común también portan genes de resistencia para otros tipos de antimicrobianos. Por lo tanto la microbiota de los alimentos derivados de animales constituye un reservorio importante de este tipo de genes de resistencia y es probable que exista un flujo de estas bacterias multirresistentes entre el humano y la cadena alimenticia, que puede representar un papel importante en esta transferencia. Por esto, es importante estudiar y monitorear las formas de propagación de la multirresistencia en bacterias como *E. coli* multirresistente aislada de diferentes ecosistemas, como son los alimentos de origen animal. Este tipo de estudios, aún no han sido considerados en nuestro país, lo que hace importante este proyecto.

JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno de alto impacto en la salud humana. Sin embargo, este problema se extiende también a la sanidad de animales de crianza destinados para consumo humano.

Este hecho se ve favorecido por la transferencia de cepas resistentes a antibióticos al hombre ya sea mediante la cadena alimenticia o por contacto directo con los animales. En este sentido, los microorganismos comensales como *E. coli* pueden actuar como reservorios de genes de resistencia y posteriormente transferirlos por vía horizontal a otras bacterias, agravando de esta manera el problema de la multiresistencia.

En el presente trabajo se caracterizó parcialmente la transferencia de la multiresistencia mediada por plásmidos con la finalidad de entender los mecanismos de diseminación en aislamientos de *E. coli* de origen alimentario.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer el mecanismo de transferencia de la multirresistencia a antibióticos utilizado por cepas de *E. coli* de origen alimentario.

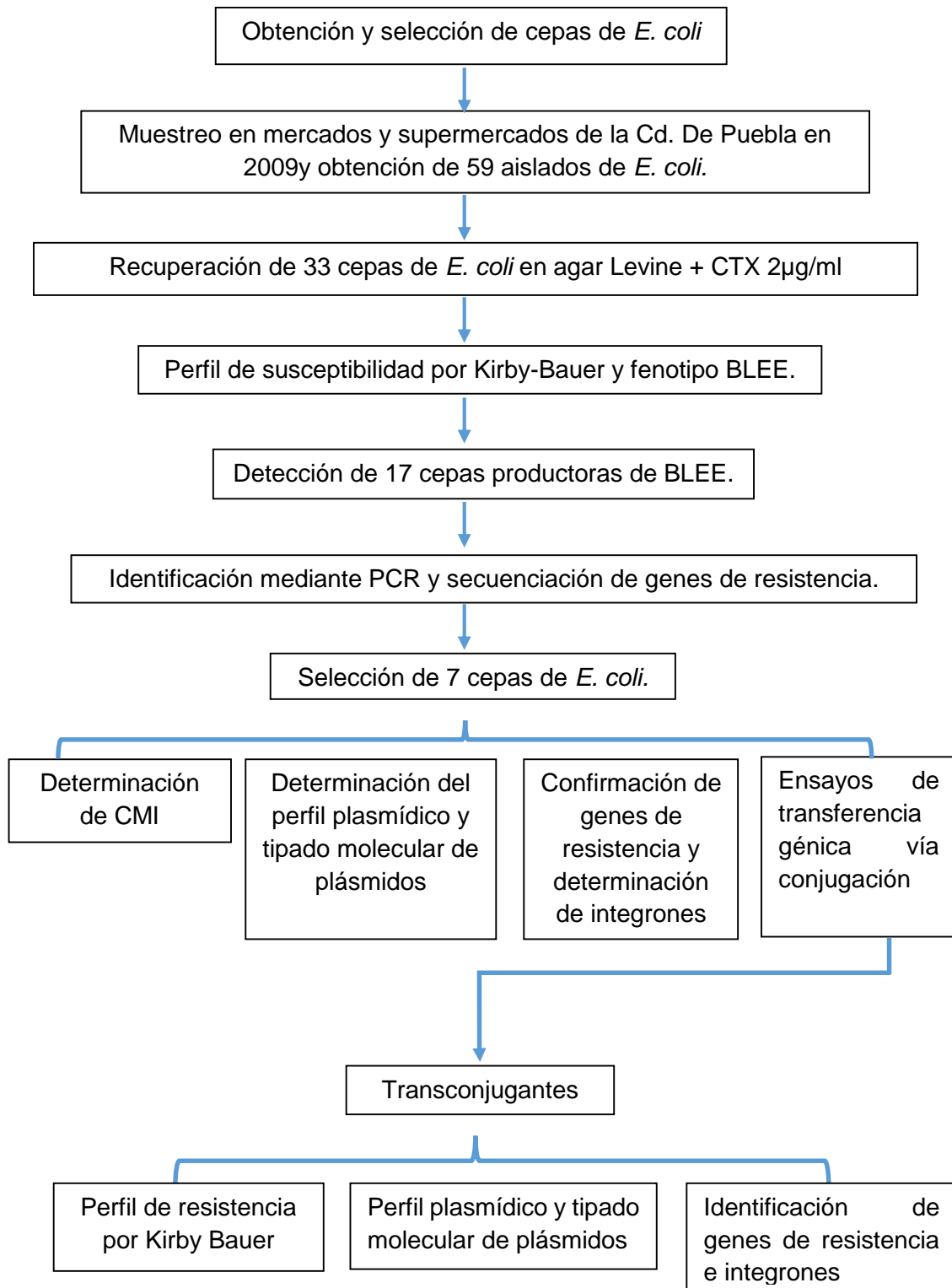
OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar el perfil plasmídico de cepas multirresistentes de *E. coli* de origen alimentario.
- ✓ Determinar la calidad de la transferencia de la multirresistencia a los antibióticos.
- ✓ Caracterizar parcialmente los plásmidos involucrados en la resistencia.
- ✓ Determinar la presencia de otros elementos genéticos móviles en cepas multirresistentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil de resistencia y plasmídico en los aislamientos de *E. coli*.
- Realizar experimentos de conjugación utilizando las cepas de *E. coli* de origen alimentario como donadoras y como receptora una cepa resistente a rifampicina.
- Determinar del perfil plasmídico y de resistencia de las transconjugantes.
- Tipificar mediante PCR replicones de plásmidos asociados con multirresistencia a antibióticos y secuenciar el amplicón para determinar los grupos de incompatibilidad.
- Identificar mediante PCR y secuenciación integrasas y genes de resistencia para determinar el tipo de integrón en algunas cepas.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

De una colección de 59 cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdo y de pollo de diferentes mercados y supermercados de la Cd. de Puebla en 2009, se seleccionaron 33 cepas potencialmente resistentes a antibióticos betalactámicos que crecieron en placas de agar Levine suplementado con 2 µg/ml de CTX. Posteriormente, a 17 de las mismas se les detectó mediante Kirby Bauer un fenotipo multirresistente y un fenotipo BLEE positivo. De estas cepas, se eligieron 7 cepas debido a su perfil de resistencia determinado en un estudio previo. La tabla 1 muestra las características de las cepas seleccionadas.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos cárnicos, multidrogoresistentes productoras de BLEES en Puebla, México.

CEPA	ORÍGEN	FENOTIPO DE RESISTENCIA	ST	FILOGENIA	β-LACTAMASAS	Integrones
BUAP253	CERDO	AMP, AMC SAM, CF, CAZ, CRO, CTX, FEP, ATM, S, NA, LVX, CIP, TE, C, TMP, SXT	1266	B2	OXA-1, CTX-M2	3 integrones
BUAP360	POLLO	AMP, AMC, CF, CRO, CTX, FEP, ATM, N, AN, NN, NA, CIP, TE, TMP, SXT	155 CC1 55	B1	CTX-M1	2 integrones
BUAP382	CERDO	AMP, AMC, CF, FOX, CAZ, CRO, CTX, S, N, NA, CIP, TE, C, TMP, SXT	10 CC1 0	B1	CMY-2	2 integrones
BUAP402	POLLO	AMP, AMC, CF, FOX, CAZ, CRO, CTX, ATM, S, NA, LVX, CIP, TE	359	B1	CMY-2	1 integrón
BUAP426	POLLO	AMP, AMC, CF, FOX, CAZ, CRO, CTX, S, GM, NN, NA, TE, C	12 CC1 2	B2	-	-
BUAP433	POLLO	AMP, CF, CAZ, CRO, CTX, ATM, S, N, GM, NN. NA. LVX, CIP, TE, TMP, SXT	617 CC1 0	B1	TEM-1B, CTX-M15	1 integrón
BUAP442	POLLO	AMP, CF, CAZ, CRO, FEP, CTX, ATM, S, N, GM, NN. NA. LVX, CIP, TE, TMP, SXT	501	D	CTX-M2	2 integrones

2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados son de la marca Bioxon® y fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

- **Agar Levine:** se empleó para el cultivo selectivo de cepas de *E. coli*, se suplementó con CTX a 2 o 4 µg/ml.
- **Agar Mc Conkey:** se empleó para el cultivo selectivo de cepas de *E. coli* y de transconjugantes suplementando con los antibióticos de selección según la cepa (Rifampicina a 100 µg/ml, CTX a 4 µg/ml, CIP a 4 µg/ml).
- **Caldo Luria-Bertani (LB):** medio empleado para el crecimiento de cepas para extracción de ADN plasmídico. A este medio se le adicionaban además, los antibióticos de selección dependiendo de la cepa de la que se tratara: (Rifampicina a 100 µg/ml, CTX a 4 µg/ml, CIP a 4 µg/ml).
- **Agar Trypticosa de Soya (TSA):** Empleado para el crecimiento de cepas una vez descongeladas para posteriormente realizar antibiograma o CMI.
- **Agar Mueller Hinton (MH):** se empleó para la determinación de la sensibilidad a antibióticos como cuenta mínima inhibitoria (CMI) y antibiograma.
- **Infusión Cerebro Corazón (BHI):** medio empleado para el almacenamiento de cepas en viales con glicerol al 50% (vol/vol).

3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE RESISTENCIA

Los métodos empleados para determinar la sensibilidad a antibióticos fueron los siguientes.

3.1. Método de difusión por disco o antibiograma por Kirby-Bauer.

El antibiograma por el método Kirby Bauer se les realizó a las cepas transconjugantes obtenidas, al mismo tiempo que se comprobó la susceptibilidad de las cepas donadoras para comparar los perfiles obtenidos. Para realizar este método se partió de un cultivo bacteriano puro de cada cepa en placa de 18-24 horas de crecimiento. Se inoculó con algunas colonias un tubo con 3 ml de solución salina isotónica al 0.85% y se resuspendió en vórtex. Se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana, de tal manera que se alcanzará un valor

MATERIAL Y MÉTODOS

de 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml. Posteriormente se impregnó un hisopo de algodón estéril con esa suspensión y se inocularon placas de agar Mueller Hinton de manera uniforme de tal manera que el crecimiento fuera en forma de 'césped bacteriano'.

Una vez realizado lo anterior, se colocaron 7 discos de papel impregnados de antibiótico a una concentración determinada (Tabla 2) con ayuda de una pinza estéril. Se esperaron algunos minutos para asegurarse que los discos estuvieran bien adheridos al agar, se invirtieron las placas y se incubaron por 24 horas a 37°C. La lectura de los halos de inhibición se realizó una vez transcurrido este tiempo y la interpretación se realizó según los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) (Tabla 2), el cual nos permite valorar según el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en milímetros la sensibilidad de un determinado microorganismo frente a cada antibiótico y clasificarlo como sensible (S), resistente (R) o con sensibilidad intermedia (I).

Tabla 2. Antibióticos, concentración y diámetro del halo de inhibición para determinar el perfil de resistencia de las transconjugantes.

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN (µg/ml)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
			R	I	S	
Betalactámicos	Ampicilina	AMP	10	≤13	14-16	≥17
	Amoxicilina-Ácido clavulánico	AMC	20/10	≤13	14-17	≥18
	Cefalotina	CF	30	≤13	15-17	≥18
	Cefoxitina	FOX	30	≤14	15-17	≥18
	Ceftazidima	CAZ	30	≤17	18-20	≥21
	Ceftriaxona	CRO	30	≤22	23-25	≥26
	Cefotaxima	CTX	30	≤22	23-25	≥26
	Cepéfime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
	Aztreonam	ATM	30	≤17	18-20	≥21
	Meropenem	MEM	10	≤19	20-22	≥23
	Imipenem	IMP	10	≤19	20-22	≥23
Aminoglucósidos	Estreptomina	S	10	≤11	12-14	≥15
	Gentamicina	GM	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AN	30	≤14	15-16	≥17
	Trobamicina	NN	10	≤12	13-14	≥15
Quinolonas	Ácido nalidíxico	NA	30	≤13	14-18	≥19
	Levofloxacino	LVX	5	≤13	14-16	≥17
	Ciprofloxacino	CIP	5	≤15	16-20	≥21
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30	≤11	12-14	≥15
Otros	Cloranfenicol	C	30	≤12	13-17	≥18
	Trimetoprim	TMP	5	≤10	11-15	≥16
	Trimetoprim- Sulfametoxazol	SXT	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible.
Fuente: CLSI, 2013.

3.2. Método de dilución en agar

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la menor cantidad de antibiótico necesario para inhibir el crecimiento bacteriano después de 24 horas (CLSI, 2013).

Para la realización de esta prueba se partió de igual manera que en la difusión por disco de un cultivo bacteriano puro de cada cepa en placa de 18-24 horas de crecimiento, ajustando una suspensión bacteriana en NaCl (0.85%) al tubo 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml. Posteriormente, se hizo una dilución 1:10 para obtener una concentración de 1.5×10^7 UFC/ml y se depositaron por triplicado 2 µl de esta suspensión en placas con agar Mueller

Hinton suplementadas con los antibióticos que se evaluaron en la prueba de CMI (Tabla 3), de manera que el inóculo al final fue de 1.5×10^4 UFC/ml.

La preparación de las placas con el antibiótico, se realizó diluyendo a la mitad de forma seriada la máxima concentración a emplear de cada antibiótico como se indica en la tabla 3. Se realizó el cálculo para añadir a cada placa la cantidad de antibiótico necesario para obtener cada concentración que se muestra en la tabla 3 y además se prepararon placas sin antibiótico como controles de crecimiento inicial y final.

Tabla 3. Concentraciones de los antibióticos utilizados en cada placa para la realización de la CMI.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)									
CTX	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
CIP	512	256	128	64	32	16	8	4	2	

CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacino

3.3. Detección fenotípica de betalactamasas

La identificación fenotípica de las betalactamasas de espectro extendido se realizó mediante la prueba de difusión con doble disco, basado en la capacidad de inhibición hacia las BLEES que poseen los inhibidores de beta-lactamasas (Ácido Clavulánico, Sulbactam y Tazobactam). El inhibidor posee como parte de su estructura al anillo betalactámico característico de los antibióticos betalactámicos, esta similitud en la estructura química de ambos compuestos permite que la betalactamasa se una irreversiblemente al inhibidor ya que tiene más afinidad por el mismo, dejando actuar al antibiótico sin que se hidrolice. La producción de una BLEE se aprecia observando la formación de una “cola de pescado” o en forma de “huevo” entre el disco del inhibidor y el del antibiótico β -lactámico.

El procedimiento utilizado es el mismo que se utiliza para un antibiograma de difusión por disco, lo que varía después de inocular la placa a manera de césped bacteriano es la colocación de los sensidiscos de los antibióticos, La técnica

consiste en colocar alrededor de un disco de AmC u otro disco con cualquier otro inhibidor a una distancia de 1.5 a 2 cm, discos de cefotaxima, ceftazidima, cefepime y aztreonam. Esta prueba se realizó a las transconjugantes obtenidas de las cepas seleccionadas utilizando como controles las cepas silvestres donadoras.

4. EXTRACCIÓN DE ADN

4.1. Extracción de ADN total

Extracción por el método de hervido. Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante ebullición. Se partió de un cultivo bacteriano puro crecido durante 18 h en agar TSA, posteriormente se colectó una asada bacteriana y se resuspendió en 800 µl de agua inyectable estéril, se agitó con ayuda del vórtex y se colocó durante 10 minutos en un baño con agua hirviendo. Una vez transcurrido el tiempo, se volvió a agitar con vórtex y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se recogió en un tubo eppendorf limpio y estéril. Finalmente, se midió la concentración de DNA en el Nano drop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific® para asegurarse que la concentración de ADN estuviera entre 200-400 ng/µl. Cuando fue necesario se ajustó la concentración con agua inyectable estéril y se guardó a -20°C. Este ADN se usó como templado en las reacciones de PCR.

4.2. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen® y el método de lisis alcalina para extraer plásmidos de bajo peso molecular, mientras que para la extracción de plásmidos de alto peso molecular se utilizó el método de Kieser (Kieser, 1984). Estas técnicas se describen a continuación:

A. Extracción de plásmidos por el método de Kieser

Esta técnica permite una extracción de DNA plasmídico partiendo de 5ml de cultivo bacteriano. Para su realización, primero se inoculó una colonia de la cepa de la que se deseaba extraer el ADN en tubos con 5 ml de LB y se dejó crecer por 16 horas a 37°C con agitación a 150-200 rpm. Posterior al tiempo de incubación, los tubos se colocaron en un recipiente con hielo durante 15 minutos para detener el metabolismo de las células.

Una vez realizado lo anterior, se cosecharon las células por medio de centrifugación a 13,000 rpm durante 3 min a 4°C. Se decantó el LB procurando que la pastilla quedara con la menor cantidad de medio posible y se adicionaron 400µl de solución I, la pastilla se resuspendió suavemente con una pipeta. Posterior a esto, se le adicionaron 100µl de lisozima (10mg/ml) y se invirtió suavemente para mezclar. Esta mezcla, se dejó incubando a 4°C durante 30 minutos.

Después de ese tiempo, se le adicionaron 250 µl de solución II, se mezcló, se incubó por 30 minutos a 55°C y se dejó enfriar en agua por 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se agregaron 80 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) de Invitrogen® y se mezcló por vórtex hasta que se tornó una coloración blanca uniforme. Después, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 20 minutos y del sobrenadante se recuperaron 450 µl.

De los 400 µl se tomaron 70 µl para cargarlos en un gel de agarosa al 0.7%. El corrimiento electroforético se realizó por 6 horas a 4°C en un buffer TBE 1X. Para el corrimiento electroforético se usó como marcador de peso molecular la cepa de *E. coli* NCTC 50192 proporcionada por el D. C. Ulises Garza Ramos del Instituto Nacional de Salud Pública y como control negativo la cepa de *E. coli* J53 sin plásmidos.

B. Lisis alcalina

Se inoculó una colonia de la cepa de la que se deseaba extraer el ADN en tubos con 5 ml de LB y se dejó crecer por 16 horas a 37°C con agitación a 150-200 rpm.

Una vez transcurrido este tiempo se cosecharon 3 ml del cultivo bacteriano por medio de centrifugación a 10,000 rpm durante 3 min. Se decantó el LB procurando que la pastilla quedara con la menor cantidad de medio posible y se adicionaron 400µl de solución 1, la pastilla se resuspendió suavemente con una pipeta y se dejó incubar esta mezcla por 5 minutos en la estufa a 37°C.

Después, se agregaron 300 µl de la solución 2 y se mezcló por inversión, las muestras se pusieron en hielo durante 10 minutos.

Posterior a esto, se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3M, se agitaron las muestras fuertemente y se dejaron en hielo de 10 a 15 minutos para posteriormente centrifugar a 12, 000 rpm durante 15 minutos.

El sobrenadante se colectó en tubos nuevos y se les agregó 1ml de isopropanol. Las muestras se dejaron con el isopropanol durante 1 hora y después se centrifugaron a 12, 000 rpm por 10 minutos.

Se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 200 µl de etanol al 70%, se mezcló por inversión hasta despegar la pastilla y se centrifugó a 12, 000 rpm por 5 minutos.

Una vez realizado lo anterior, se recuperó la pastilla y se dejó secar durante 10 minutos en la estufa a 37°C para finalmente resuspenderla en 50 µl de agua inyectable estéril.

De los 50 µl, se cargaron 10 µl en un gel de agarosa al 0.7%. El corrimiento electroforético se realizó por 80 minutos a temperatura ambiente en un buffer TAE 1X.

4.3 TIPADO DE PLÁSMIDOS POR “PCR-BASED REPLICON TYPING” (PBRT)

El tipado de los plásmidos de las cepas se realizó mediante la técnica propuesta por Carattoli *et al.*, en 2005, que consiste en la amplificación mediante PCR de los replicones de la mayoría de los grupos de incompatibilidad de plásmidos de enterobacterias descritos hasta el momento. Los componentes y cantidades empleadas para un volumen final de 25 µL en cada tubo de reacción de PCR se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de los reactivos utilizados para realizar las PCR multiplex para la determinación de los grupos de incompatibilidad.

COMPONENTE (DISTRIBUIDOR)	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN POR TUBO	CONCENTRACIÓN FINAL DE REACCIÓN
Oligonucleótido forward (T4oligo)	25 µM	0.3 µL c/u	0,5 µM
Oligonucleótido reverse (T4oligo)	25 µM	0.3 µL c/u	0,5 µM
TAQ Polimerasa	5 U/µL	0.1 µL	1.5 U
Buffer	10 X	1 µL	1 X
MgCl ₂	50 mM	1 µL	1,5 mM
dNTPs mix	10 µM	0.4 µL	0,05 mM
DNA	---	--- µL	---
Agua inyectable estéril	---	5.2 µL	---
		10 µL	

5. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La identificación genotípica de los mecanismos de resistencia de las transconjugantes se realizó mediante la técnica de PCR en un termociclador TProfessional TRO Biometra® bajo las condiciones que se muestran en la tabla 5. En todas las reacciones se metió como control negativo el ADN de la cepa receptora de *E. coli* C600 la cual no posee ninguno de estos mecanismos y como

control positivo la cepa donadora correspondiente, confirmando a su vez la presencia de estos genes en las cepas silvestres.

Tabla 5. Reactivos y cantidades empleadas en las PCR.

COMPONENTE (DISTRIBUIDOR)	CONCENTRACIÓN STOCK	VOLUMEN POR TUBO	CONCENTRACIÓN FINAL DE REACCIÓN
Oligonucleótido forward (Sigma/T4oligo)	25 µM	0.3 µL	0,5 µM
Oligonucleótido reverse (Sigma/T4oligo)	25 µM	0.3 µL	0,5 µM
TAQ Polimerasa	5 U/µL	0.1 µL	1.5 U
Buffer	10 X	1 µL	1 X
MgCl ₂	50 mM	1 µL	1,5 mM
dNTPs mix	2,5 mM	0.4 µL	0,05 mM
DNA	---	---- µL	---
Agua inyectable estéril	---	6.4 µL	---
		10 µL	

Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a cloranfenicol y sulfonamidas.

Cebadores (secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño del amplicón)
<i>gen cmlA</i>				
FW: TGTCATTTACGGCATACTCG	94°C	5min	1 ciclo	Saéñz <i>et al.</i> , 2004 (455 pb)
RV: ATCAGGCATCCCATTCCCAT	94°C	1 min	30 ciclos	
	55 °C	1 min		
	72°C	1min		
	72°C	7 min	1 ciclo	
<i>gen sul3</i>				
FW: GAGCAAGATTTTTGGAATCG	94°C	5min	1 ciclo	Perreten <i>et al.</i> , 2003 (990 pb)
RV: CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	94°C	1 min	30 ciclos	
	51 °C	1 min		
	72°C	1min		
	72°C	5 min	1 ciclo	

Las tablas 6, 7 y 8 muestran los oligonucleótidos y condiciones empleados para la amplificación de los genes indicados en cada tabla.

Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a betalactamasas.

Cebadores (secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño de amplicón)
gen bla_{TEM} TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC TEM-R: ACGCTCAGTGGAAACGAAAAC	94°C	3 min	1 ciclo	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994 (1150 pb)
	94°C	1 min		
	60°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
gen bla_{OXA-1} OXA-1-F: CCAAAGACGTGGATG OXA-1-R: GTTAAATTCGACCCCAAGTT	96°C	5 min	1 ciclo	Briñas <i>et al.</i> , 2003 (442 pb)
	96°C	1 min		
	61°C	1 min	35 ciclos	
	72°C	2 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	
gen bla_{CTX-M-1} CTX-M-1-F: GGTTAAAAAATCACTGCGYC CTX-M-1-F: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	94°C	5 min	1 ciclo	Briñas <i>et al.</i> , 2005 (843 pb)
	94°C	30 seg		
	52°C	30 seg	35 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
gen bla_{CTX-M-2} CTX-M-1-F: ATGATGACTCAGAGCATTTCG CTX-M-1-F: TCAGAAACCGTGGGTTAC	94°C	7 min	1 ciclo	Bertrand <i>et al.</i> , 2006 (876 pb)
	94°C	50 seg		
	50°C	40 seg	35 ciclos	
	68°C	1 min		
	72°C	5 min	1 ciclo	
gen bla_{CMY-2} CMY-2-F: CMY-2-R:	94°C	3 min	1 ciclo	1807 pb
	94°C	1 min		
	60°C	1 min	30 ciclos	
	72°C	1 min		
	72°C	10 min	1 ciclo	

Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos de PCR y condiciones de amplificación de genes de resistencia a tetraciclina.

Cebadores (secuencia 5' - 3')	Condiciones de amplificación			Referencia (Tamaño de amplicón)
gen tetA tetA-F: GTAATTCTGAGCACTGTTCGC tetA-R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	95°C	5 min	1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (937 pb)
	95°C	30 seg		
	62°C	30 seg	23 ciclos	
	72°C	45 seg		
	72°C	7 min	1 ciclo	
gen tetB tetB-F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG tetB-R: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	94°C	5 min	1 ciclo	Guardabassi <i>et al.</i> , 2000 (416 pb)
	94°C	30 seg		
	57°C	30 seg	25 ciclos	
	72°C	20 seg		
	72°C	7 min	1 ciclo	

La tabla 9 muestra los oligonucleótidos utilizados para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica propuestos inicialmente por Carattoli y colaboradores en 2005 y además incluye aquellos modificados o nuevos descritos por García-Fernández *et al.*, 2009 y Villa *et al.*, 2010.

Para el tipado de los plásmidos se realizaron cinco PCR multiplex y 13 PCR simples para el análisis de todos los replicones descritos.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica.

REPLICÓN	SECUENCIA (5' - 3')	AMPLICÓN (PB)
IncHI1	F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471
IncHI2	F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644
Incl1	F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139
IncX	F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376
IncL/M	F: GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785

MATERIAL Y MÉTODOS

IncN	F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559
IncFIA	F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462
IncFIB	F: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702
IncW	F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242
IncY	F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R: GCGAGAATGGACGATTACAAACTTT	765
IncP	F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534
IncFIC	F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R: TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT	262
IncA/C	F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465
IncT	F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750
IncFIIS	F: CTGTCGTAAGCTGATGGC R: CTCTGCCACAACTTCAGC	270
IncFrepB	F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG R: GAAGATCAGTCACACCATCC	270
IncK	F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160
IncB/0	F: GCGGTCCGGAAGCCAGAAAAC R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159
IncFIBs	F: TGCTTTTATTCTTAACTATCCAC R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683
IncFIIs	F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC	259-260
IncFII	F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT R: CACACCATCCTGCACTTA	258-262
IncFD	F: CTGATCGTTTAAGGAATTTT R: GGAATGTAGCACCCGAT	700
IncFIly	F: TGGYAGGGAACTGGTTCTG R: GTRAGTCACACCTTCCCGC	227

IncFIIk	F: TCTTCTTCAATCTTGGCGGA R: GCTTATGTTGCACRGAAGGA	142-148
IncR	F: TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	251
IncU	F: TCACGACACAAGCGCAAGGG R: TCATGGTACATCTGGGCGC	843
oricolE	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGCGAAACCCGACAGGAC	187
oricolETp	F: GTTCGTGCATACAGTCCA R: GGTTTACCGGTGTCATTCC	106

F: Forward
R: Reverso

Las condiciones de amplificación de todas las reacciones de tipado de plásmidos fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94°C, 5 min.); 30 ciclos (94°C, 1 min.; 60°C, 30 seg. y 72°C, 1 min.) y elongación final (72°C, 5 min.). En el caso de las PCR para la amplificación de grupos de incompatibilidad IncFIIIs, IncB/0 e IncFD, la temperatura de alineamiento fue 62°C en lugar de 60°C.

6. ANÁLISIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora y posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) 0.5 g/L durante 30 segundos y se lavaron en agua destilada por 1 minuto. Para observar los fragmentos de DNA, los geles se fotografiaron en un fotodocumentador Bio-Imaging Systems®. En todos los corrimientos electroforéticos se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb plus de Fermentans®.

7. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se purificaron a partir del gel de agarosa mediante el kit de Zymoclean Recovery kit® utilizando el siguiente procedimiento:

1. Se corrió un gel de agarosa para separar los productos de la reacción de PCR con los productos de interés.
2. La banda de interés se cortó minimizando el tiempo de exposición a la UV tanto como sea posible y a baja longitud de onda (302 nm).

3. El pedazo de gel cortado se depositó en un tubo eppendorf de 1.5mL.
4. Se agregaron 3 volúmenes del buffer DBO.
5. Se incubó de 50 a 55°C hasta disolver la agarosa (10 min).
6. Una vez bien disuelta la agarosa, esa solución se pasó por una columna del kit y se centrifugó 1 min a 13 000 rpm. El sobrenadante se tiró.
7. Posteriormente, se agregó el buffer de lavado y centrifugó 1 min a 13,000 rpm. Se tiró el sobrenadante. Se repitió este lavado.
8. Se colocó la columna dentro de un tupo eppendorf nuevo estéril y se eluyó el DNA en 22 µl de agua estéril inyectable. Se centrifugó 1 min y se desechó la columna.
14. Finalmente, se corrió 1 µl del DNA en un gel de agarosa para observar la cantidad de DNA y se midió en el Nanodrop para asegurar que hubiera buena concentración de DNA (10ng/100 pb).

8. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES AMPLIFICADOS

Los genes de interés se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias recibidas se visualizaron en el programa BioEdit y se analizaron con ayuda de herramientas informáticas en la web (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>), del National Center for Biotechnology Information Site (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), donde se compararon con las bases de datos del GenBank. Los alineamientos se realizaron con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

10. CONJUGACIÓN

Con base en los valores de punto de corte establecidos por el CLSI 2013 a partir de los cuales una cepa se considera resistente a estos antibióticos y a aquellos obtenidos en la CMI se seleccionaron las concentraciones de los antibióticos a ensayar en los experimentos de conjugación, las cuales fueron las siguientes: CTX 4µg/mL y CIP 4µg/mL.

Se utilizaron 3 placas controles (Fig. 3): una suplementada con rifampicina para asegurar que solo creciera la cepa receptora C600 resistente a rifampicina, la segunda placa suplementada con CIP y CTX para asegurar que solo creciera la donadora y la tercer placa sin antibiótico donde se observara el crecimiento de ambas cepas.



Fig. 3. Placas controles utilizadas en los ensayos de conjugación.

Cabe mencionar que como un control extra, en la CMI (CIP y CTX) que se realizó a las 6 cepas que se someterían a conjugación también se incluyó la cepa que se utilizó como receptora C600 de *E. coli* resistente a rifampicina para confirmar que no fuera resistente a estos antibióticos y evitar falsos positivos cuando se seleccionaran las transconjugantes.

La metodología empleada se describe a continuación: A partir de un cultivo puro en placa de TSA suplementado con el antibiótico correspondiente de cada cepa (donadora y receptora) se inoculó una colonia de cada una en tubos diferentes con 3 ml de caldo LB. Se dejaron crecer en agitación a 250 rpm y a 37°C hasta que alcanzaran una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, equivalente a 1×10^8 UFC/ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente, se tomaron 200 μ l de la cepa donadora y 2000 μ l de la receptora C600 resistente a rifampicina (relación 1:10) y se inocularon en 500 μ l de caldo LB y se dejaron 4 horas a 37°C sin agitación. Se mezcló suavemente.

A partir de este inóculo, se realizaron diluciones seriadas en tubos eppendorf (Fig. 4) con 900 μ l cada uno de la siguiente manera:

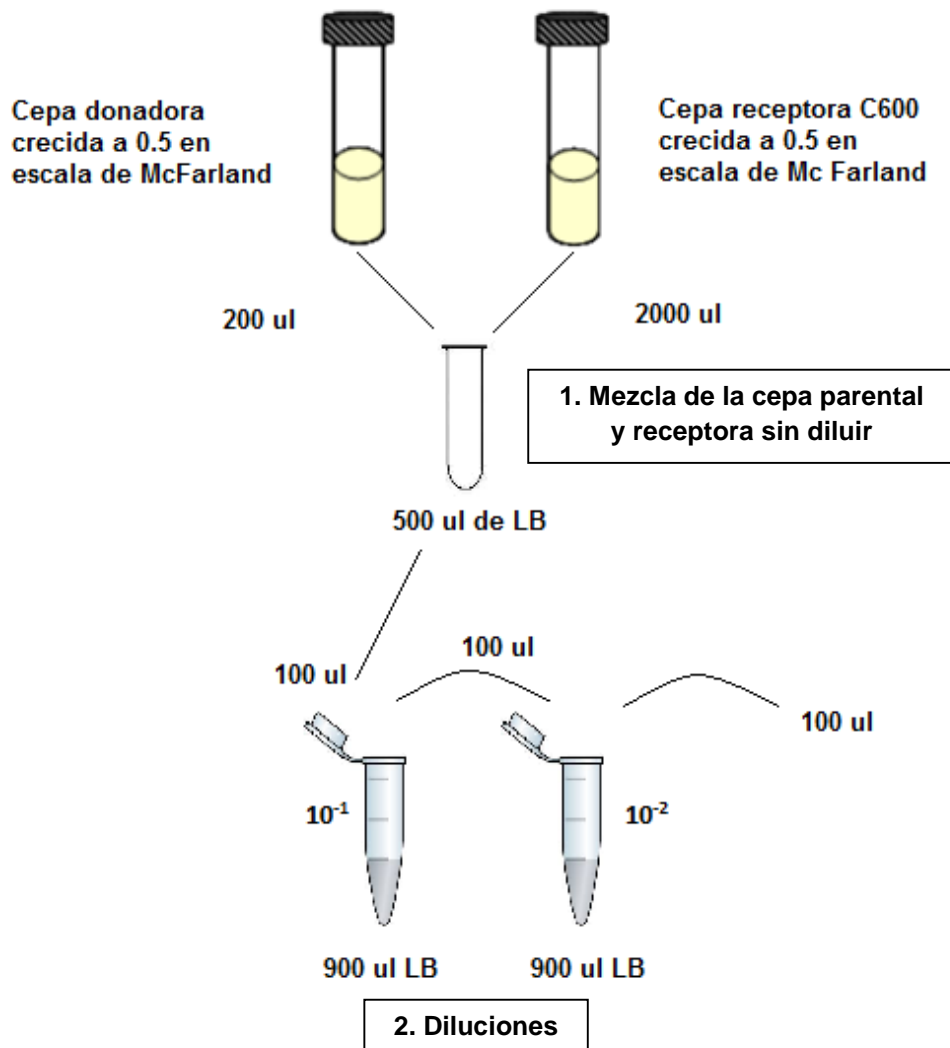


Fig. 4 Diluciones realizadas en los experimentos de conjugación

Finalmente, se tomaron 100 μ l de cada uno de los tubos anteriores, incluyendo la mezcla sin diluir y se inocularon en placas de LB suplementadas con antibiótico, de manera que al plaquear con la espátula las diluciones quedaron como se muestra en la figura 5.

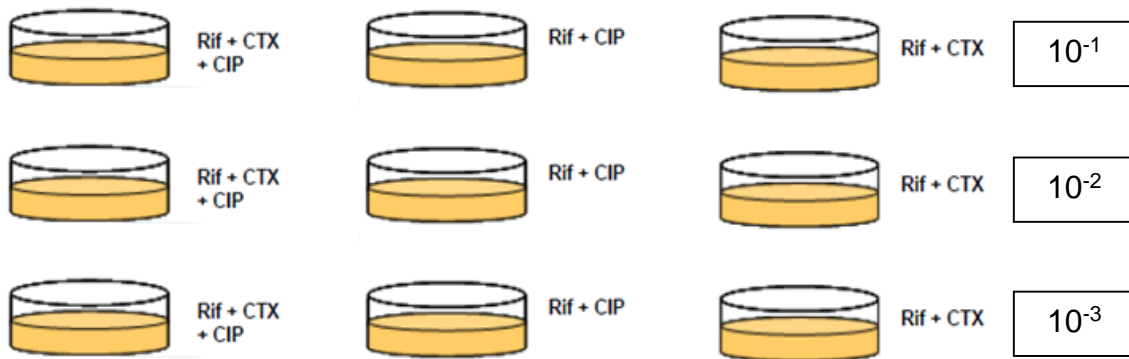


Fig. 5. Placas para seleccionar transconjugantes.

El inóculo se extendió con una varilla de vidrio hasta secarse. Una vez inoculadas todas las placas se incubaron a 37°C de 24-48 horas.

La selección de transconjugantes se realizó una vez transcurrido el tiempo de incubación. Se eligieron 3 colonias al azar de las placas en las que se observó crecimiento y se resembraron en placas con los mismos antibióticos y a la misma concentración de donde se aislaron. Finalmente se resembraron en placas de agar McConkey para corroborar que se tratara de transconjugantes ya que la cepa donadora C600 resistente a rifampicina no fermenta la lactosa debido a una deleción en lacZ, por lo tanto, las colonias transconjugantes se observarían blancas no fermentadoras de lactosa.

RESULTADOS

En un estudio previo en el año 2009, se realizó un muestreo a mercados y supermercados de la ciudad de Puebla, a partir del que se obtuvieron 59 aislados de *E. coli*, de alimentos cárnicos de pollo y cerdo. De estos, se recuperaron 33 cepas de *E. coli* presuntivamente resistentes a antibióticos betalactámicos que crecieron en agar Levine con CTX (2 ug/ml), a las cuales se les realizó perfil de susceptibilidad y producción fenotípica de BLEE. Con estos criterios, se seleccionaron 17 cepas con fenotipo de BLEE, a las cuales se les buscó genes de resistencia mediante PCR y secuenciación. De este estudio se seleccionaron 7 cepas para incluirlas en este proyecto.

Las 7 cepas de *E. coli* de origen alimentario seleccionadas de acuerdo a su perfil de susceptibilidad, fenotipo BLEE y presencia de genes de resistencia hacia antibióticos B-lactámicos y quinolonas principalmente, fueron las siguientes: cepas BUAP253, BUAP 360, BUAP382, BUAP 402, BUAP 426, BUAP 433, y BUAP 442. La cepa BUAP 426 no presenta genes de resistencia a antibióticos B-lactámicos, ni integrones, por lo que de primera instancia se eligió pensando en que podría no contener los plásmidos que pudieran portar las otras cepas multirresistentes. A las 6 cepas restantes se les realizó la Concentración Mínima Inhibitoria hacia cefotaxima y ciprofloxacina.

1. PERFIL DE RESISTENCIA EN LOS AISLAMIENTOS DE *E. coli* DE ORIGEN ALIMENTARIO

La Concentración Mínima Inhibitoria se realizó mediante el método de dilución en agar, hacia cefotaxima (CTX) y ciprofloxacino (CIP) a las 6 cepas BUAP descritas arriba y a la cepa *E. coli* C600 que sería utilizada como cepa receptora para los experimentos de conjugación, la cual es sensible a CTX y CIP. Los valores más elevados de la CMI fueron obtenidos en las cepas BUAP253, BUAP 360, BUAP 433 y BUAP442 (Tabla 10). Con base en estos resultados se procedió a realizar los experimentos de conjugación.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria hacia CTX y CIP de 6 cepas de *E. coli* aisladas de alimentos cárnicos.

CEPA	CTX µg/ml	CIP µg/ml
BUAP253	512	512
BUAP360	256	64
BUAP382	16	32
BUAP402	16	32
BUAP433	256	128
BUAP442	256	128
<i>E. coli</i> C600	<1	<1

CTX: Cefotaxima; CIP: Ciprofloxacino

*Cepa de *E. coli* utilizada como receptora en los ensayos de conjugación. Se excluyó la cepa BUAP426 ya que no se realizaron experimentos de conjugación a dicha cepa.

Puntos de corte para ambos antibióticos según CLSI, 2014: S: <1 I: 2 R:>4

2. PERFIL PLASMÍDICO DE LOS AISLAMIENTOS DE *E. coli* DE ORIGEN ALIMENTARIO

Se obtuvo el perfil plasmídico de las 7 cepas de *Escherichia coli* de origen alimentario seleccionadas y observándose la presencia de estos elementos genéticos móviles en 4 de 7 de estas cepas (Fig. 6). En la figura 6 se observa la presencia de estos elementos genéticos móviles en las cepas BUAP360, BUAP402, BUAP433, BUAP442 tanto de alto como de bajo peso molecular, sin embargo, en la cepa BUAP253 no se observó la presencia de plásmidos.

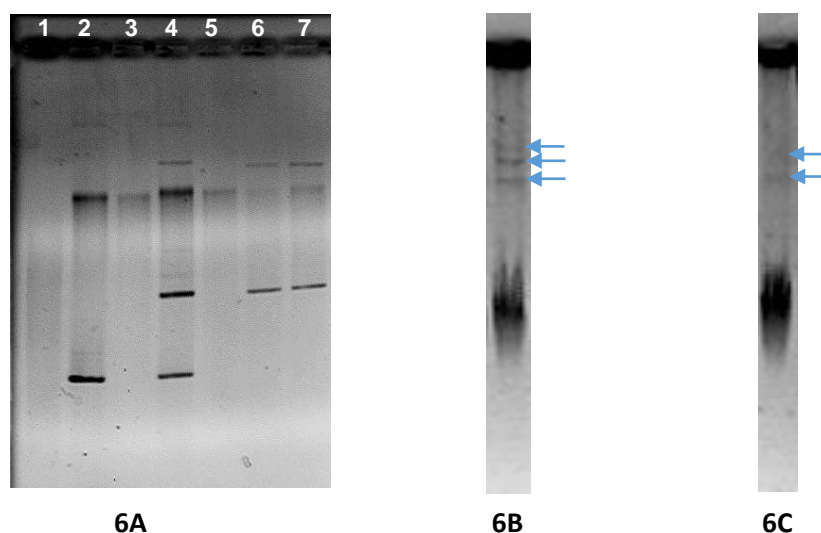


Fig. 6. Perfil plasmídico de *E. coli* aisladas de alimentos cárnicos. **Figura 6A:** Extracción plasmídica con el kit de Qiagen®, Qiaprep Spin Miniprep. **Carril 1:** BUAP253 (negativo), **carril 2:** BUAP360, **carril 3:** BUAP382 (negativo), **carril 4:** BUAP402, **carril 5:** BUAP426 (negativo), **carril 6:** BUAP433, **carril 7:** BUAP442. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 0.7% en buffer TAE 1x durante 80 minutos a temperatura ambiente. **Figura 6B:** BUAP382. **Figura 6C:** BUAP426. El corrimiento electroforético de los gels de las figuras 6B y 6C se realizó en agarosa al 0.7% en buffer TBE 1x durante 6 horas a 4°C. Las extracciones de plásmidos de las figuras 6B y 6C se realizaron con la técnica de Kieser.

Como se puede observar, los plásmidos de las cepas BUAP382 Y BUAP426 fueron visibles cuando se utilizó la técnica de Kieser para plásmidos de alto peso molecular, no así cuando se utilizaron el kit de Qiagen (Fig. 6) ni la técnica de la lisis alcalina (dato no mostrado).

3. ENSAYOS DE TRANFERENCIA GÉNICA VÍA CONJUGACIÓN.

Se estudió la transferencia de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos mediante conjugación de 6 cepas, excluyendo la cepa BUAP426 debido a que esta no presentó genes de betalactamasas ni otros genes que confieren resistencia conocidos por ser mediados vía plasmídica. Los antibióticos de selección usados fueron CTX y CIP, cuyos valores en la CMI para cada cepa se indican en la tabla 10. Sin embargo, la concentración de antibiótico utilizada para seleccionar las transconjugantes fue a partir de la cual una cepa se considera

resistente a estos antibióticos según el CLSI, 2013, es decir, a 4 µg/ml para ambos. Las transconjugantes obtenidas para cada cepa se muestran en la tabla 11.

Para el caso de la cepa 402 se realizaron tres ensayos con estos mismos antibióticos de selección pero debido a que no se obtenían transconjugantes se decidió cambiarlos por CAZ y TE y de igual manera la concentración de ambos para seleccionar las transconjugantes fue a partir de la cual se considera que una bacteria es resistente a los mismos (4 µg/ml y 16 µg/ml respectivamente).

Tabla 11. Transconjugantes obtenidas en los experimentos de conjugación.

CEPA DONADORA	CEPAS TRANSCONJUGANTES
BUAP253	TCBUAP253-1;RIF+CIP+CTX TCBUAP253-2;RIF+CIP TCBUAP253-3;RIF+CIP TCBUAP253-4;RIF+CIP TCBUAP253-5;RIF+CTX
BUAP360	TCBUAP360-1;RIF+CIP+CTX TCBUAP360-2;RIF+CTX TCBUAP360-3; RIF+CTX TCBUAP360-4; RIF+CTX TCBUAP360-5; RIF+CTX TCBUAP360-6; RIF+CTX TCBUAP360-7; RIF+CTX
BUAP382	TCBUAP382-1; RIF, CTX
BUAP402	TCBUAP402-1; RIF + Te TCBUAP402-2; RIF +Te
BUAP433	TCBUAP433-1; RIF, CTX
BUAP442	TCBUAP442-1; RIF+CIP+CTX TCBUAP442-2; RIF+CIP+CTX TCBUAP442-3; RIF+CIP+CTX TCBUAP442-4; RIF+CIP

A) EFICIENCIA DE CONJUGACIÓN

Debido a que de todas las cepas se obtuvo un número diferente de transconjugantes como se observa en la Tabla 11, se decidió calcular la eficiencia de conjugación de la cepa BUAP360 ya que fue la cepa de la cual se obtuvo un mayor número de transconjugantes y facilitaría el cálculo de la eficiencia de transferencia, para lo cual se realizaron 3 ensayos diferentes y se obtuvo un promedio de las colonias obtenidas en cada una de las placas con las respectivas diluciones como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. UFC obtenidas en los tres ensayos de conjugación de la cepa BUAP360 de *E. coli* para calcular la eficiencia de transferencia.

PLACAS	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
Placa 1 Dilución 10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	INCONTABLE
Placa 2 Dilución 10 ⁻²	167 UFC	206 UFC	120 UFC
Placa 3 Dilución 10 ⁻³	10 UFC	43 UFC	10 UFC

(No. de transconjugantes) (Dilución de la placa contable)
 (Concentración escala McFarland)

$$\frac{(167 \text{ UFC}) (1 \times 10^{-2})}{1 \times 10^8} = 1.67 \times 10^{-6} \quad \frac{(206 \text{ UFC}) (1 \times 10^{-2})}{1 \times 10^8} = 2.06 \times 10^{-6}$$

$$\frac{(120 \text{ UFC}) (1 \times 10^{-2})}{1 \times 10^8} = 1.2 \times 10^{-6}$$

Promedio = 1.64 x 10⁻⁶

La tasa promedio de la eficiencia de conjugación fue de 1.64 x 10⁻⁶ UFC, lo cual no indica que esta cepa tiene una buena eficiencia de transferencia.

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA.

Para realizar la caracterización de los plásmidos involucrados en la transferencia de la resistencia se seleccionaron las cepas BUAP360, BUAP402, BUAP433 y sus transconjugantes TcBUAP360-1, TcBUAP360-2, TcBUAP402-1 y TcBUAP433-1 respectivamente debido al perfil de resistencia (Kirbi Bauer y presencia de genes de resistencia) de estas cepas determinado en un estudio previo, además del perfil plasmídico (Fig. 6) y la concentración mínima inhibitoria realizados en este estudio a estas cepas. La tabla 13 muestra los genes de resistencia y los resultados de la CMI de las cepas seleccionadas.

Tabla 13. Criterios de selección de cepas para la caracterización de plásmidos involucrados en la transferencia de la resistencia.

CEPA	β -LACTAMASAS	CMI CIP/CTX ($\mu\text{g/ml}$)
BUAP360	CTX-M-1	256/64
BUAP402	CMY-2	16/32
BUAP433	TEM1b, CTX-M-15	256/128

4.1. Determinación del perfil plasmídico de las transconjugantes.

Para comparar el perfil plasmídico de las cepas silvestres y sus transconjugantes (Fig. 7) se utilizó el método de Kieser, utilizando como marcador de peso molecular la cepa de *E. coli* NCTC 50192 cuyos pesos moleculares son ya conocidos (Tabla 14) y como control negativo la cepa J-53 de *E. coli*.

En la tabla 15 se muestra la migración en milímetros de los plásmidos de las cepas de *E. coli* de origen alimentario junto con las cepas controles utilizadas. Como se puede observar, las cepas estudiadas en esta tesis poseen plásmidos que migraron por encima del plásmido de mayor peso molecular (<20 mm) de la cepa control *E. coli* NCTC 50192 de 154 kb, asimismo se observaron plásmidos que migraron en el gel dentro del rango del marcador (entre 20 – 31 mm), pero

no se observaron plásmidos que migraran por debajo de 33 mm que es el último plásmido de la cepa control.

Tabla 14. Pesos moleculares de la cepa control *E. coli* NCTC 50192.

PM	mm
154 kb	20
66	27
48	33

Tabla 15. Cálculo estimado de los pesos moleculares de los plásmidos involucrados en la transferencia de la resistencia en las cepas de *E. coli* obtenidas de alimentos en estudio.

CARRIL/CEPA	DISTANCIA (mm)
1. <i>E. coli</i> 50192	20
	27
	33
2. BUAP253	n/d
3. BUAP360	n/d
4. TcBUAP360-1	17
	23
5. TcBUAP360-2	23
6. BUAP382	16
	18
	22
7. BUAP402	19
	22
	31
8. TcBUAP402-1	22
9. BUAP426	18
	22
10. BUAP433	n/d
11. TcBUAP433-1	19
	21
12. BUAP442	19
	21
	31
13. C-: J-53	C -

n/d: no determinado
C - : Control negativo

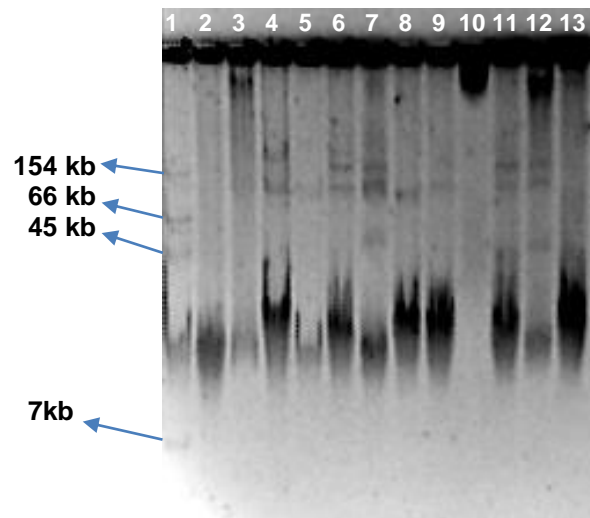


Fig. 7. Perfil plasmídico de las cepas silvestres de *E. coli* obtenidas de alimentos y transconjugantes. Se indica la migración de las bandas de ADN plasmídico en mm. **Carril 1:** *E. coli* 50192 con plásmidos de 20 mm, 27 mm y 33 mm; **carril 2:** BUAP253 no se observó la presencia de plásmidos; **carril 3:** BUAP360, aunque en este ensayo no se observaron plásmidos, en ensayos anteriores se observaron 3 plásmidos; **carril 4:** TCBUAP360-1 plásmidos que migraron 17 mm y 23 mm; **carril 5:** TCBUAP360-2 plásmido que migró 23 mm; **carril 6:** BUAP382 plásmidos que migraron 16 mm, 18 mm y 22 mm; **carril 7:** BUAP402 plásmidos 19 mm, 22 mm y 31 mm; **carril 8:** TCBUAP402 plásmido que migro 22 mm; **carril 9:** BUAP426 plásmidos con migración en el gel de 18 mm y 22 mm; **carril 10:** BUAP433, aunque en este ensayo no se observaron plásmidos, en ensayos anteriores se observaron 2 plásmidos; **carril 11:** TCBUAP433 plásmidos con migración de 19 mm y 21 mm; **carril 12:** BUAP442 plásmidos que migraron 19 mm, 21 mm y 31 mm; **carril 13:** *E. coli* J-53 como control negativo sin plásmidos.

En el caso de las cepas silvestres BUAP360 y BUAP433 que no se observaron plásmidos en el ensayo mostrado en la Fig. 7 pero si en sus transconjugantes TCBUAP360-1, TCBUAP360-2 y TCBUAP433, la presencia de estos elementos si se observó en otros ensayos (Fig. 6), por lo que de esta manera, se tiene un panorama general para comparar los perfiles plasmídicos entre estas cepas y sus transconjugantes.

4.2. Determinación del perfil fenotípico de resistencia de las transconjugantes

Una vez obtenidas y seleccionadas las transconjugantes y realizado el perfil plasmídico de las mismas se procedió a determinarles el perfil fenotípico de resistencia para determinar que resistencias se habían transferido mediante los plásmidos detectados anteriormente (Tabla 16).

Tabla 16. Determinación del perfil fenotípico de resistencia de las cepas silvestres de *E. coli* de origen alimentario y sus transconjugantes mediante el método de Kirby Bauer.

CEPA/TC (Antibiótico de selección)	ANTIBIÓTICOS																				FENOTIPO BLEE	
	AMP	AMC	CF	FOX	CAZ	CTX	FEP	CRO	ATM	S	N	GM	AN	NN	NA	CIP	LVX	TE	C	SXT		TMP
BUAP360	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	+
TC1-BUAP360; (RIF, CIP,CTX)	R	I	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	+
TC2-BUAP360; (RIF, CTX)	R	I	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-
BUAP402*	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	S	S	S	+
TC1- BUAP402; (RIF, TE)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-
TC2- BUAP402; (RIF, TE)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	-
BUAP433	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	+
TC1- BUAP433: (RIF,CTX)	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	+

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible RIF: Rifampicina; CTX: cefotaxima; CIP: ciprofloxacino.*Para la obtención de transconjugantes de la cepa BUAP402 fue necesario usar antibióticos de selección diferentes a los que se usaron con las otras cepas (Tetracilina y Ceftazidima), ya que con ciprofloxacino y cefotaxima no se obtuvieron transconjugantes.

4.3. Perfil genotípico de resistencia de las transconjugantes

Por otro lado, en las transconjugantes seleccionadas se amplificaron los genes *bla* detectados previamente en las cepas silvestres de *E. coli*, para lo cual se usaron como control positivo a la cepa silvestre correspondiente y como control negativo a la cepa C600 de *E. coli* que se utilizó como receptora en los experimentos de conjugación. Las figuras 8, 9 y 10 muestran la amplificación de los genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} y *bla*_{CMY-2} respectivamente. En la tabla 17 se muestran los genes codificantes para betalactamasas que amplificaron en las cepas de *E. coli* de este estudio. Una vez que se amplificaron los genes, se purificaron y se mandaron a secuenciar, para posteriormente analizar las secuencias con las ya reportadas en el GenBank.

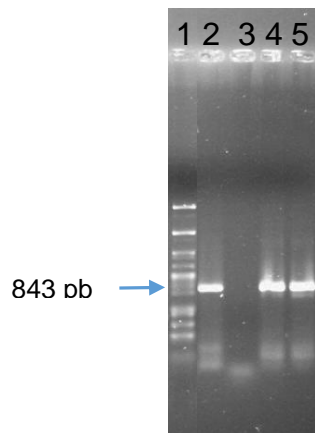


Fig. 8. Amplificación del gen *bla*_{CTX-M-1}. **Carril 1:** Marcador de PM 100 pb. **2.** Control positivo cepa BUAP360, **3.** Control negativo: *E. coli* C600, **4.**TCBUAP360, **5.**TCBUAP433

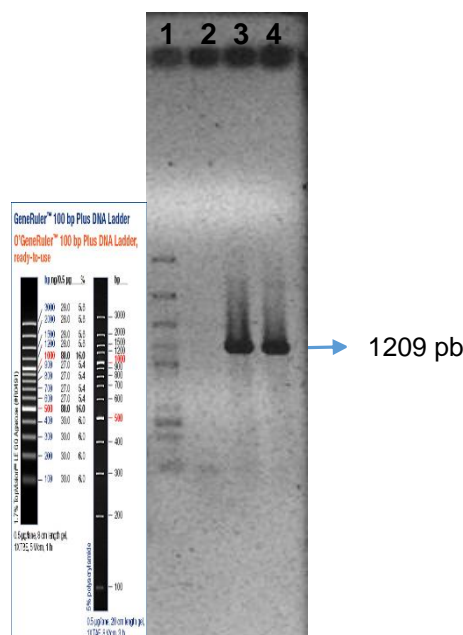


Fig. 9. Amplificación del gen *bla*_{TEM}. **Carril 1:** Marcador de PM 100 pb. **2.** Control negativo cepa C600 de *E. coli*, **3.** Control positivo BUAP433, **4.**TCBUAP433

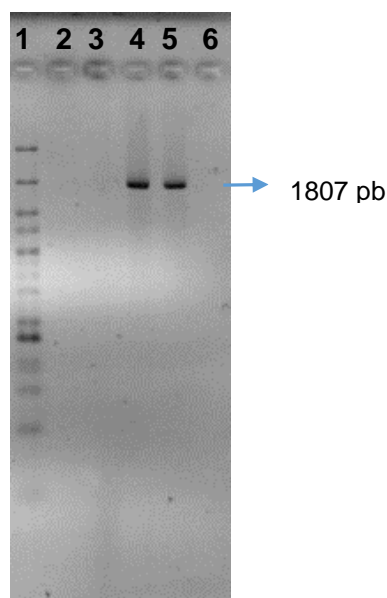


Fig. 10. Amplificación del gen *bla*_{CMY-2}. Carril 1: Marcador de PM 100 pb. 2. Control negativo cepa *E. coli* C600, 3. Blanco, 4. Control positivo BUAP402, 5. TCBUAP382, 6. TCBUAP402.

Tabla 17. Genes *bla* detectados en las cepas silvestres de *E. coli* aisladas de alimentos cárnicos y sus transconjugantes.

CEPA/(TC)	OXA-1	CTX-M-2	CTX-M-1*	CTX-M-15*	CMY-2	TEM-1B*
BUAP253/TcBUAP 253-1	+/-	+/-	-	-	-	-
BUAP360 / Tc BUAP360-1/ Tc BUAP3602	-	-	+/+/-	-	-	-
BUAP382/Tc BUAP382-1	-	-	-	-	+/+	-
BUAP402 /Tc BUAP402-1/Tc BUAP402-2	-	-	-	-	+/-/-	-
BUAP433 /Tc BUAP433-1	-	-	-	+/+	-	+/+
BUAP442/Tc BUAP442-1	-	+/-	-	-	-	-
BUAP426	-	-	-	-	-	-

*Genes secuenciados en cepas silvestres y sus transconjugantes.

5. TIPADO MEDIANTE PCR DE REPLICONES DE PLÁSMIDOS ASOCIADOS CON MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD.

Los grupos de incompatibilidad o replicones de los plásmidos asociados con la multirresistencia fueron identificados por el método descrito por Carattoli *et al.*, 2005 como se mencionó anteriormente. Se realizaron 5 reacciones múltiplex y 13 reacciones simples (Tabla 18).

Tabla 18. Reacciones de PCR realizadas para determinar los grupos de incompatibilidad plasmídica.

PCR	GRUPO DE INCOMPATIBILIDAD	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
Multiplex 1	Inc HI1, Inc HI2, Inc I	471, 644, 139
Multiplex 2	Inc X, Inc L/M, Inc N	376, 785, 559
Multiplex 3	Inc FIA, Inc FIB, Inc W	462, 702, 242
Multiplex 4	Inc Y, Inc P, Inc FIC	765, 534, 262
Multiplex 5	Inc A/C, Inc T	465, 750
Simplex 1	Inc K/B	160
Simplex 2	Inc FIIs	259-260
Simplex 3	Inc B/O	159
Simplex 4	Inc FIBs	683
Simplex 5	Inc FII	285-262
Simplex 6	Inc FD	700
Simplex 7	Inc FIIy	227
Simplex 8	Inc FIIk	142-148
Simplex 9	Inc R	251
Simplex 10	Inc U	843
Simplex 11	Inc colE	187
Simplex 12	Inc colETP	106
Simplex 13	Inc FrepB	270

En las figuras 11 y 12 se muestran algunos de los grupos de incompatibilidad identificados en las cepas silvestres de *E. coli* obtenidas de alimentos, la identificación de estos grupos de incompatibilidad en sus transconjugantes se hizo posteriormente. Por otro lado, en las figuras 13 y 14 se muestran en el mismo gel los grupos de incompatibilidad detectados tanto en las cepas silvestres como en sus transconjugantes. Cabe mencionar que los grupos de incompatibilidad IncHI1, IncHI2, IncX, IncL/M, IncFIA, IncW, IncY, IncP, IncFIC, IncT, IncK/B, IncFIBs, IncFIIy, IncFIIk, IncR, IncU e IncFrepB no fueron encontrados en las cepas de este estudio.

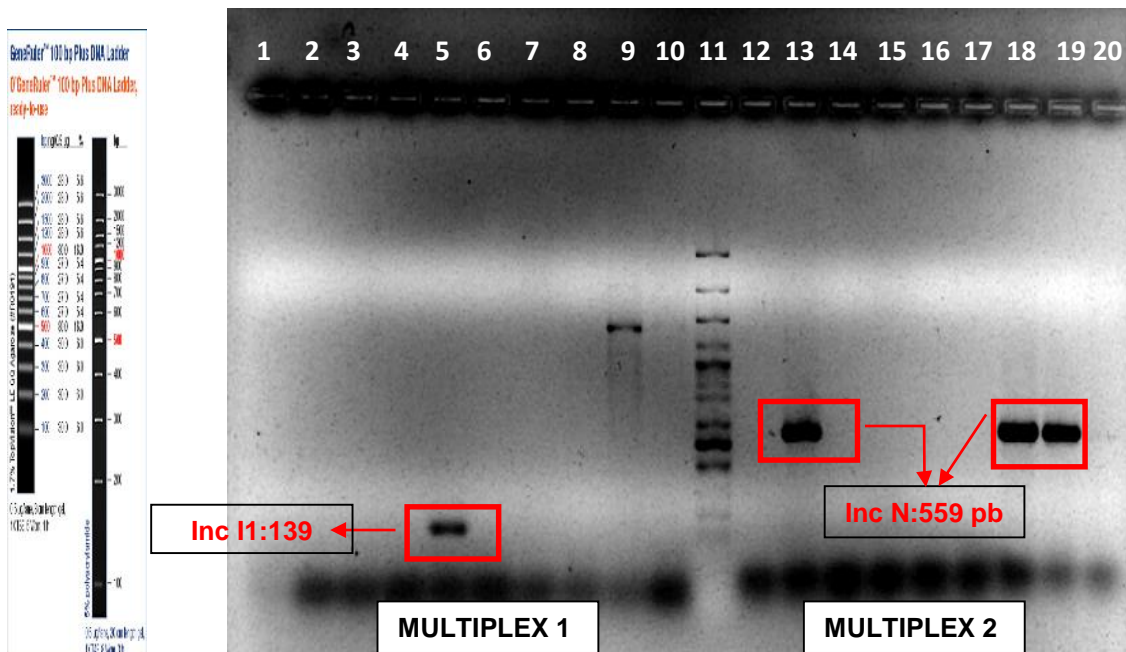


Fig. 11. Múltiplex 1 y 2. M1 de los carriles 1 al 10, la cual detecta grupos de incompatibilidad IncI1 de 139 pb, IncHI1 de 471 pb e IncHI2 de 644 pb. M2 de los carriles 12 al 20 que detecta los replicones IncX de 376 pb, IncN de 559 pb e IncL/M de 785 pb. M1. **Carril 1:** *E. coli* C600 control negativo, **carril 2:** BUAP253, **carril 3:** BUAP360, **carril 4:** BUAP382, **carril 5:** BUAP402 (positivo para IncI1 de 139 pb), **carril 6:** BUAP426, **carril 7:** BUAP433, **carril 8:** BUAP442, **carril 9:** *E. coli* pkk MC4100, **carril 10:** *E. coli* PACYC, **carril 11:** 100 pb plus. M2- **carril 12:** C600 control negativo, **carril 13:** BUAP253 (positivo para IncN de 559 pb), **carril 14:** BUAP360, **carril 15:** BUAP382, **carril 16:** BUAP402, **carril 17:** BUAP426, **carril 18:** BUAP433 (positivo para IncN de 559 pb), **carril 19:** BUAP442 (positivo para IncN de 559 pb), **carril 20:** *E. coli* pkk MC4100.

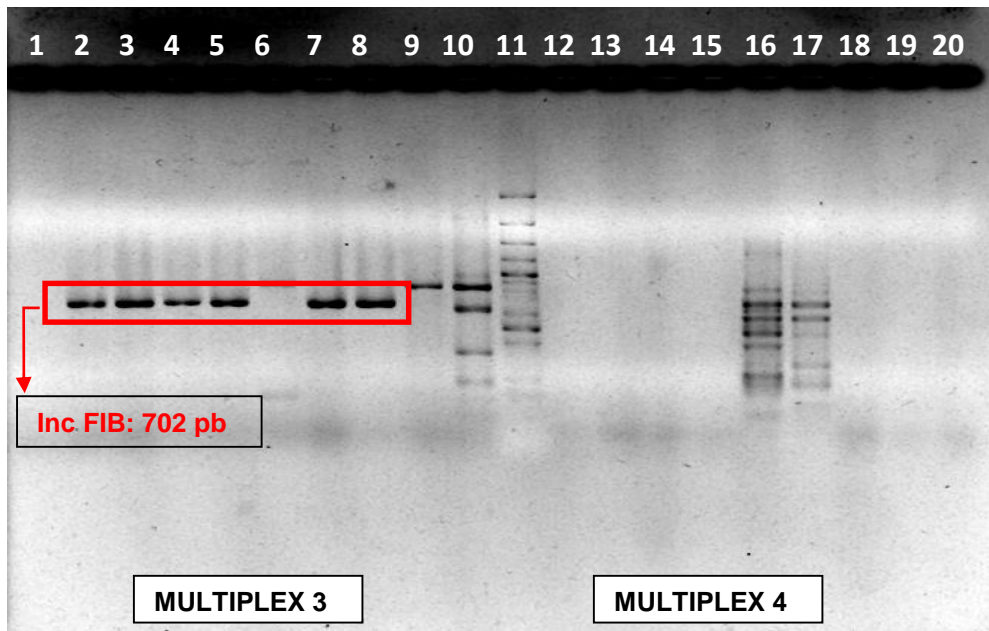


Fig. 12 Múltiplex 3 y 4. M3 de los carriles 1 al 10, la cual detecta grupos de incompatibilidad IncW de 242 pb, IncFIA de 462 pb e IncFIB de 702 pb. M4 de los carriles 12 al 20 que detecta los replicones IncFIC de 262 pb, IncP de 534 pb e IncY de 765 pb. M3. **Carril 1:** C600 control negativo, **carriles 2-8**, excepto **carril 6** (BUAP 426): positivos para IncFIB de 702 pb BUAP253, BUAP360, BUAP382, BUAP402, BUAP433, BUAP442, **carril 9:** *E. coli* pkk MC4100, **carril 10:** *E. coli* PACYC, **carril 11:** 100 pb plus. M4. **Carriles 12-20:** *E. coli* C600 control negativo, BUAP253, BUAP360, BUAP382, BUAP402, BUAP426, BUAP433, BUAP442, *E. coli* pkk MC4100 negativas para estos grupos de incompatibilidad.

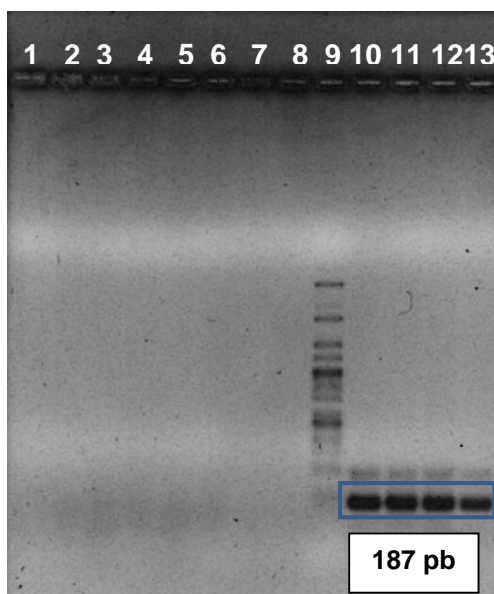


Fig. 13. Simplex 11 que detecta el grupo de incompatibilidad Inc colE de 187 pb. **Carril 1:** Cepa C600 de *E. coli* (control negativo), **carriles 2-8:** BUAP253, TCBUAP253, BUAP360, TcBUAP360, BUAP382, BUAP 402, Tc BUAP402 fueron negativas, **carril 9:** marcador de PM 100 pb, **carriles 10-13** cepas positivas: BUAP433, Tc BUAP433, BUAP442, Tc BUAP442.

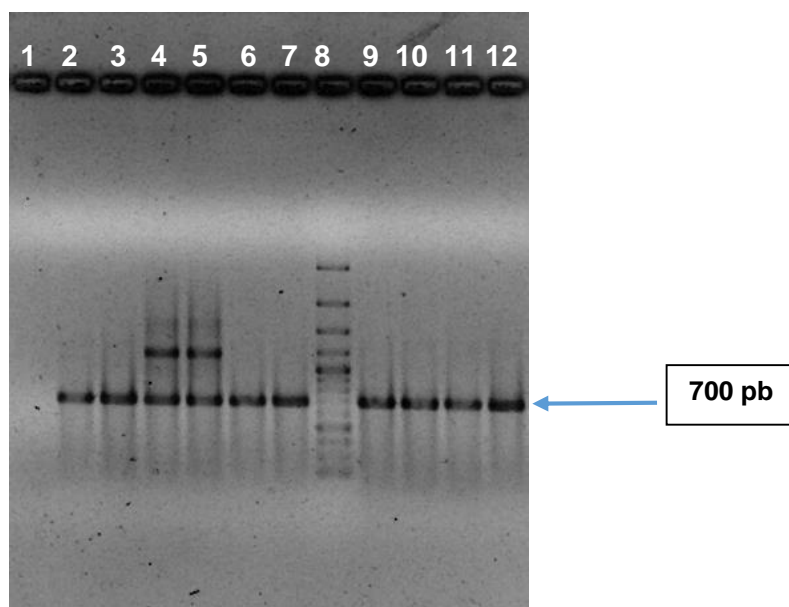


Fig.14. Simplex 6-IncFD. Se detectó el grupo de incompatibilidad FD de 700 pb. **Carril 1:** Cepa *E. coli* C600 (control negativo), **carril 2:** BUAP253, **carril 3:** TC BUAP253, **carril 4:** BUAP360, **carril 5:** TcBUAP360, **carril 6:** BUAP382, **carril 7:** TcBUAP382, **carril 8:** marcador de PM100 pb plus, **carril 9:** BUAP433, **carril 10:** TcBUAP433, **carril 11:** BUAP442, **carril 12:** Tc BUAP442.

Tabla 19. Grupos de incompatibilidad plasmídica detectados en las cepas de *E. coli* de origen alimentario y sus transconjugantes.

CEPA/(TC)	INC FII	INC FIB	INC FD	INC N	INC COL E	INC COL ETP	INC I1	INC A/C	PESO MOLECULAR (KB)
BUAP253/ TcBUAP253-1	+/+	+/+	+/+	(+)/+	-	-	-	-	n/d
BUAP360 / TcBUAP360-1/ TcBUAP360-2	+/+/ -	(+)/+ /-	(+)/+ /-	-	-	-	-	-	189, 110
BUAP382/ TcBUAP382-1	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	-	200, 170, 120
BUAP402 / TcBUAP402-1/ TcBUAP402-2	+/- /-	+/+/ +	-	-	+/+/ +	-	+/- -/-	-	155, 120, 50
BUAP433 / TcBUAP433-1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/(+)	+/+	-	-	150, 130
BUAP442/ TcBUAP442-1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	150, 130, 50
BUAP426	ND	-	ND	-	ND	ND	-	+	170, 120

ND: No determinado.

(+) Amplicones secuenciados

5.1. Secuenciación de los amplicones para determinar los grupos de incompatibilidad.

Para realizar el análisis de las secuencias de los grupos de incompatibilidad plasmídico, una vez obtenida la secuencia del respectivo amplicón se ingresó al banco de datos <http://pubmlst.org/plasmid/> (Fig. 15) la cual asigna un número de alelo a los grupos de incompatibilidad IncI1, IncHI2, IncF, IncN en IncHI1 de acuerdo a las secuencias reportadas previamente.

- **Secuencia del INC FD de la cepa TC-1BUAP360**

```
GTGGCAGGAACTGGTTCTGATGTGGATTTACAGGAGCCAGAAAAGCAAAAACCCCGATAAT
CTTCTTCAACTTTGGCGAGTACGAAAAGATTACCGGGGCCACTTAAACCGTATAGCCAAC
AATTCAGCTATGCGGGGAGTATAGTTATATGCCCGGAAAAGTTCAAGACTTCTTTCTGTGCT
CGCTCCTTCTGCGCATTGTAAGTGCAGGATGGTGTGACTGATCTTCACCAAACGTATTACC
GCCAGGTAAGAACCCGAATCCGGTGTTCACTCCCCGTGAAGGTGCCGGAACGCTGAAGT
TCTGCGAAAAACTGATGGAAAAGGCGGTGGGCTTCACCTCCCGTTTTGATTTGCGCATTCA
TGTGGCGCATGCCCGTTCCCGTGGTCTGCGTCCGCGCATGCCACCGGTGCTGCGTCCGAC
GGGCTATTGATGCGCTGCTGCAGGGGCTGTGTTTCCACTATGACCCGCTGGCCAACCGCG
TCCAGTGTTCATCACCACACTGGCCATTGAGTGCGGACTGCCGACAGAGAAAAATGCAA
AAAAC
```

1 exact match found.

Translate query

Allele	Length	Start position	End position
FI: 2	157	46	202

PubMLST Query: Sequences | Batch sequences | Compare alleles
 Download: Alleles | IncI1 profiles | IncHI2 profiles
 Links: Contents | Home | Options | PubMLST.org | Isolate Database

Allele information - FI: 2

Provenance/meta data

locus: FI
 allele: 2

sequences: CAAAACCCC GATAATCTTC TTCAACTTTS GCGAGTAGCA AAAGATTACC GGGGCCACT TAACCGTAT AGCCAACAT TCAGCTATGC GGGAGTATA GTTATATGCC GGGAAAAGTT CAAGACTTCT
 TTCGTGCTC GCTCCTTCTG GCGATTG

length: 157
 status: Sanger trace checked
 date entered: 2010-09-10
 datestamp: 2010-09-10
 sender: Laura Villa
 curator: Laura Villa, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy (E-mail: laura.villa@iss.it)

Fig. 15. Ingreso de la secuencia del grupo de incompatibilidad a <http://pubmlst.org/plasmid/>

Una vez que se ingresó la secuencia a PubMLST (Fig. 15), la base de datos nos arrojó un número de alelo y una secuencia tipo del Inc FI.

Sin embargo, debido a que la secuencia tipo era muy pequeña (157 pb) en comparación con el amplicón de 650 pb y a que no se sabía con que gen hacer el alineamiento de las secuencias, se decidió realizar un alineamiento local en la base de datos GenomeNet <http://www.genome.jp/> (Fig. 16), en la cual se ingresó la secuencia de la cepa en estudio (TC-1BUAP360) y nos arrojó que dicha secuencia es del gen *repA* que codifica para una proteína de replicación.

BLASTN Search Result

Database: genes-nt

DNA sequence database entries related to query - 141 hits

Show alignment

Entry	bits	E-val
<input checked="" type="checkbox"/> ecoj:P423_25775 replication protein	569	3e-159
<input checked="" type="checkbox"/> cro:ROD_p1021 repA1; plasmid replication initiation protein ...	563	1e-157
<input checked="" type="checkbox"/> elo:EC042_pAA152 repA1; plasmid replication	551	7e-154
<input checked="" type="checkbox"/> elo:EC042_pAA001 repA; replication protein A	551	7e-154
<input checked="" type="checkbox"/> eum:plECUMN_0069 repA; replication protein	536	2e-149
<input checked="" type="checkbox"/> eoi:ECO111_p3-15 replication protein	529	2e-147
<input checked="" type="checkbox"/> eoj:ECO26_p2-01 replication protein	529	2e-147
<input checked="" type="checkbox"/> elh:ETEC_p948_0210 repA1; replication protein of IncFII family	527	8e-147
<input checked="" type="checkbox"/> etw:ECSP_6083 replication protein	527	8e-147
<input checked="" type="checkbox"/> ecw:EcE24377A_F0037 repA; replication protein	524	1e-145

Fig. 16. Alineamiento local en la base de datos GenomeNet

Dicha base de datos realizó el alineamiento entre la secuencia problema y la secuencia del gen *repA* y además informó sobre el tipo de proteína para la que codifica y de que organismo es (Fig. 17).

```
>ecoj:P423_25775 replication protein
|_Top
Length=858

Score = 569 bits (630), Expect = 3e-159
Identities = 317/318 (99%), Gaps = 0/318 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 218 GTGACTGATCTTCACCAACGTAATTACCCGCAAGTAAAGAACCCGAATCCGGTGTCTCACT 2
Sbjct 1 GTGACTGATCTTCACCAACGTAATTACCCGCAAGTAAAGAACCCGAATCCGGTGTCTCACT 6

Query 278 CCCCGTGAAGGTGCCGAACGCTGAAGTTCTGCGAAAAACTGATGGAAAAGGCGGTGGGC 3
Sbjct 61 CCCCGTGAAGGTGCCGAACGCTGAAGTTCTGCGAAAAACTGATGGAAAAGGCGGTGGGC 1

Query 338 TTCACCTCCCGTTTTGATTTGCGCAATTCATGTGGCGCATGCCCGTTCGCCGTGGTCTGCGT 3
Sbjct 121 TTCACCTCCCGTTTTGATTTGCGCAATTCATGTGGCGCATGCCCGTTCGCCGTGGTCTGCGT 4

Query 398 CGCGCGATGCCACCGGTGCTGCGTGCACGGGCTAATTGATGCGCTGCTGCAGGGGCTGTGT 1
Sbjct 181 CGCGCGATGCCACCGGTGCTGCGTGCACGGGCTAATTGATGCGCTGCTGCAGGGGCTGTGT 2

Query 458 TTCCACTATGACCCGCTGGCCACCGCGTCCAGTGTTCACATCACCACACTGGCCATTGAG 5
Sbjct 241 TTCCACTATGACCCGCTGGCCACCGCGTCCAGTGTTCACATCACCACACTGGCCATTGAG 3

Query 518 TGGCGACTGCCGACAGAG 535
Sbjct 301 TGGCGACTGCCGACAGAG 318
```

KEGG Escherichia coli J1886: P423_25775

Entry: P423_25775 CDS T02896

Definition: replication protein

Organism: ecoj Escherichia coli J1886

Class: [BRITe hierarchy](#)

SSDB: [Ortholog](#) [Paralog](#) [Gene cluster](#) [GFT](#)

Motif: Pfam: IncFII_repA [Motif](#)

Other DBs: NCBI-GI: 55655231
NCBI-GeneID: 17433946
UniProt: U58812

Position: pJ1886_S: complement(37045..38702)
[Genome map](#)

AA seq: 285 aa [AA seq](#) [DB search](#)

NT seq: 858 nt [NT seq](#) [+upstream 0 nt](#) [+downstream 0 nt](#)

Fig. 17. Información obtenida con el alineamiento local en GenomeNet.

Con los datos anteriores se confirmó la presencia del grupo de incompatibilidad F (IncFII), alelo 2.

6. BÚSQUEDA MEDIANTE PCR Y SECUENCIACION DE INTEGRASAS Y GENES DE RESISTENCIA PARA DETERMINAR EL TIPO DE INTEGRÓN EN ALGUNAS CEPAS.

Para el cumplimiento de este objetivo se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa para determinar el tipo de integrón que portaban algunas cepas, ya que como se mencionó anteriormente, en un estudio previo se determinó la presencia de más de un integrón en algunas de ellas. Las cepas seleccionadas fueron la BUAP360, BUAP402 Y BUAP433. Las reacciones que se realizaron fueron para identificar los genes de la integrasa tipo 1 y 2; sin embargo, solo fue positiva la amplificación para integrones tipo 1 como se muestra en la Fig. 18. El gen de *int-2* no fue detectado.

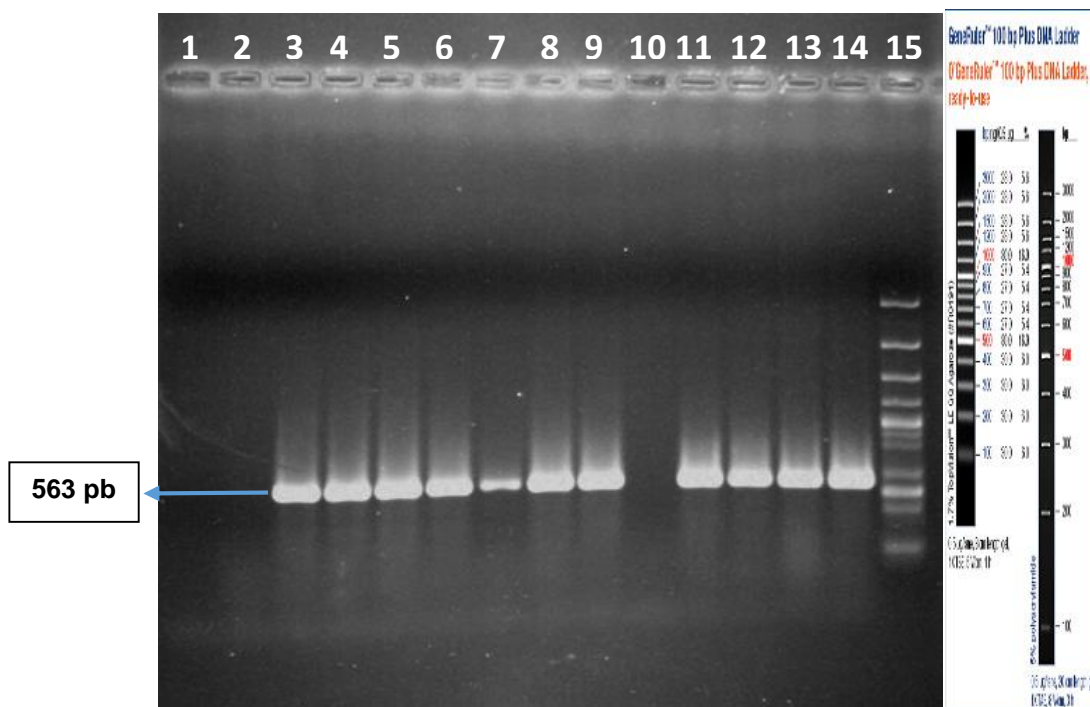


Fig. 18. Amplificación del gen *int1* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** Blanco, **carril 2:** *E. coli* C600 (control negativo), **carriles 3-9** reacciones positivas para las cepas: BUAP253, TCBUAP253, BUAP360, TCBUAP360, BUAP382, TCBUAP382, BUAP402; **carril 10:** TCBUAP402 reacción negativa, **carriles 11-14** reacciones positivas para las cepas: BUAP433, TCBUAP433, BUAP442, TCBUAP442. **Carril 15:** marcador 100 pb.

Por otro lado también se amplificaron los genes *qac* y *sul1* de la región conservada de este tipo de integrones (Figs. 19 y 20).

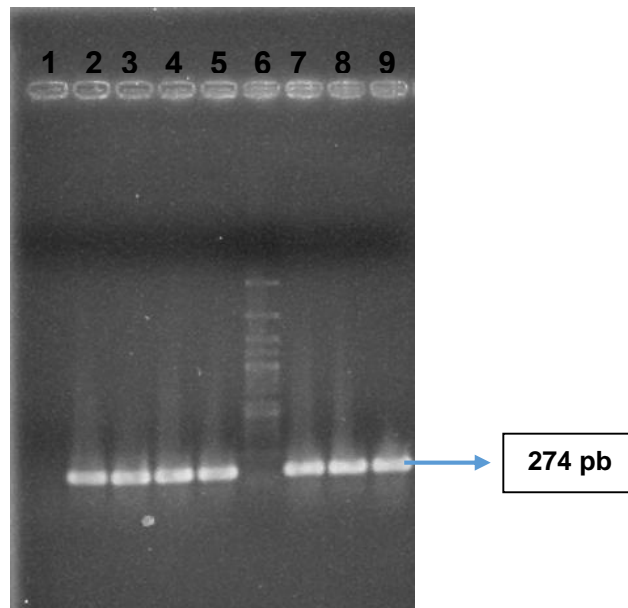


Fig.19. Amplificación del gen *qac* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** Control negativo *E. coli* C600, **carriles 2-5 y 7-9** cepas positivas: BUAP253 (Control positivo), TCBUAP253, TCBUAP360-1, TCBUAP382, TCBUAP433, TCBUAP442-1, TCBUAP442-2, **carril 6:** Marcador de PM 100 pb plus.

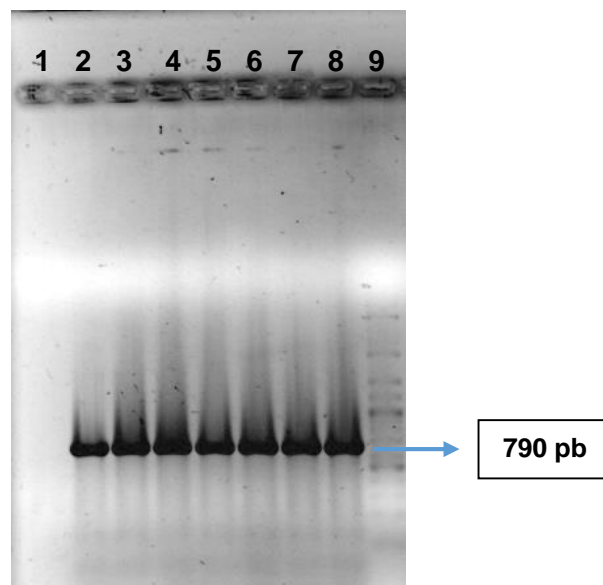


Fig. 20. Amplificación del gen *sul1* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** Control negativo *E. coli* C600, **carriles 2-8** cepas positivas: BUAP253 (Control positivo), TCBUAP253, TCBUAP360-1, TCBUAP382, TCBUAP433, TCBUAP442-1, TCBUAP442-2, **carril 9:** Marcador de PM 100 pb plus.

También se amplificaron otros genes relacionados con integrones tales como *tetA* (Fig.21), *tetB* (Fig. 22), *cmlA* (Fig. 21), *sul3* (Fig. 23).

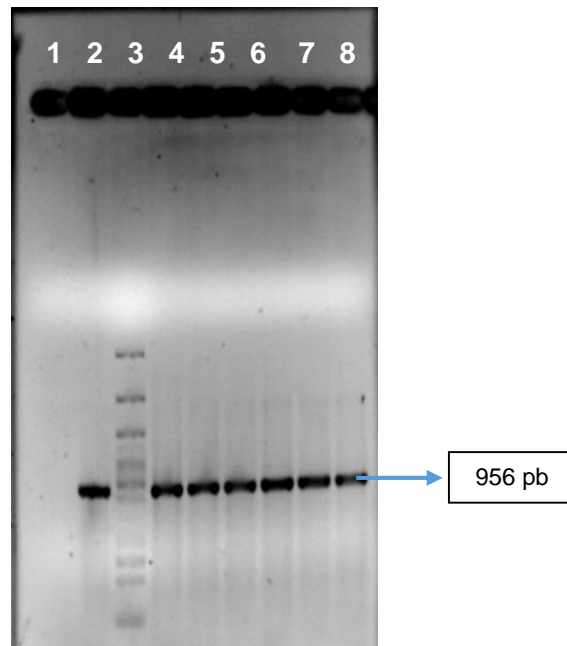


Fig.21. Amplificación del gen *tetA* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** control negativo *E. coli* C600, **Carriles 2, 4-9** cepas positivas: BUAP360 (control positivo), TCBUAP253, TCBUAP360-1, TCBUAP382, TCBUAP433, TCBUAP442-1, TCBUAP442-2. **Carril 3:** marcador 100 pb.

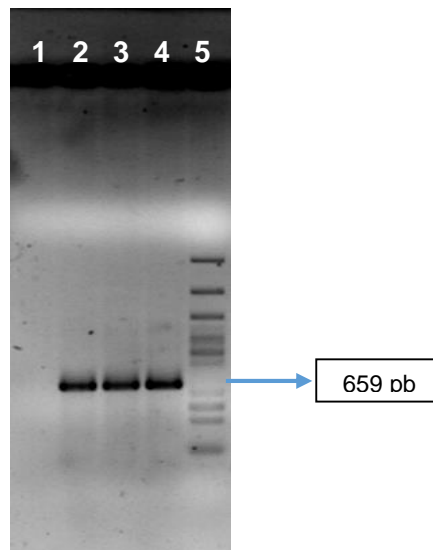


Fig. 22. Amplificación del gen *tetB* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** control negativo *E. coli* C600, **Carriles 2-4:** BUAP433 (control positivo BUAP433), TCBUAP253, TCBUAP433, **carril 5:** marcador de PM 100 pb plus.

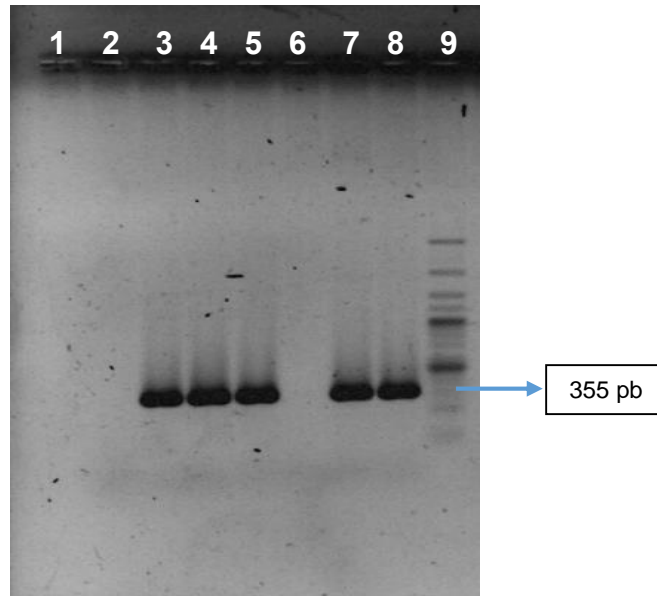


Fig. 23. Amplificación del gen *cmlA* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** Blanco, **carril 2:** control negativo *E. coli* C600, **carriles 3-5** cepas positivas: TCBUAP253, TCBUAP360-1, TCBUAP382; **carril 6:** TCBUAP402 (cepa negativa), **carriles 7-8** (cepas positivas): TCBUAP433, TCBUAP442; **carril 9:** marcador de PM 100 pb plus.

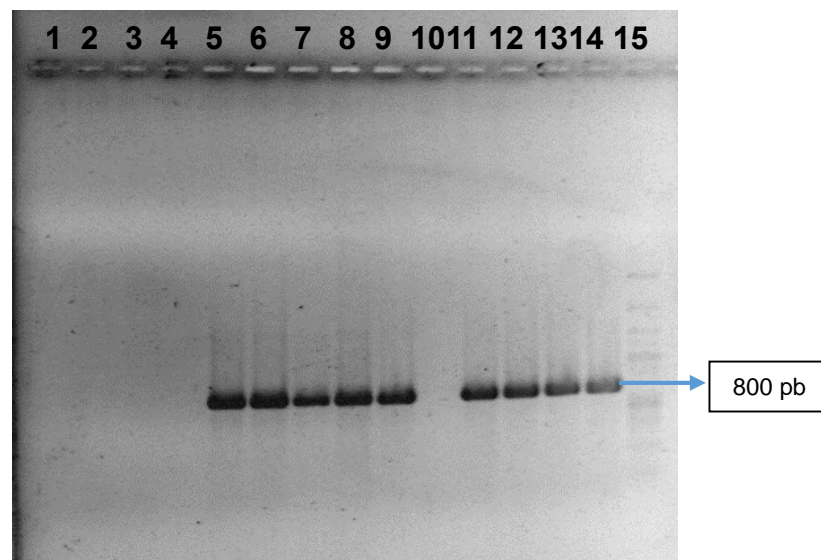


Fig. 24. Amplificación del gen *sul3* a las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos y sus transconjugantes. **Carril 1:** Blanco, **carril 2:** *E. coli* C600, **carriles 3 y 4** cepas negativas: BUAP253, TCBUAP253; **carriles 5-9** cepas positivas: BUAP360, TCBUAP360, BUAP382: TCBUAP382, BUAP402; **carril 10** cepa negativa: TCBUAP402; **carril 11-14:** BUAP433, TCBUAP433, BUAP442, TCBUAP442; **carril 15:** marcador de PM 100 pb plus.

Los resultados de los genes asociados con integrones se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Integrasas y genes de resistencia en cepas de *E. coli* de origen alimentario y sus transconjugantes.

CEPAS	5' CS		3' CS		REGIÓN VARIABLE			
	<i>int1</i>	<i>qac</i>	<i>sul</i>	<i>cmlA</i>	<i>sul3</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	
360	(+)	+	+	(+)	(+)	+	-	
TC360-1; RIF, CIP, CTX	+	+	+	+	+	+	-	
TC360-1; RIF, CTX	-	-	-	-	-	+	-	
402	+	+	+	+	+	+	-	
TC402-1: RIF+Te	-	-	-	-	-	+	-	
TC402-2: RIF+Te	-	-	-	-	-	+	-	
433	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+	
TC433-1; RIF,CTX	+	+	+	+	+	+	+	

(+) Genes secuenciados

También se amplificó la región variable de los integrones de estas cepas para comparar el patrón de bandeo con cepas controles ya secuenciadas y así poder determinar la presencia de otros genes que pudieran estar almacenados dentro de la región variable de estos integrones (Fig. 25). Posteriormente se mandaron a secuenciar las bandas para confirmar que se tratara del mismo integrón.

Las cepas controles utilizadas fueron las siguientes: cepas de *E. coli* C7204, la cual posee en su región variable un gen de adenilasa *aadA* de 800 pb, cepa C4433 que posee un arreglo génico en su región variable *dfrA1* + *aadA1* de 1700 pb y la cepa C7722 con un arreglo de *dfrA17*+ *aadA5* en su región variable de 2500 pb.

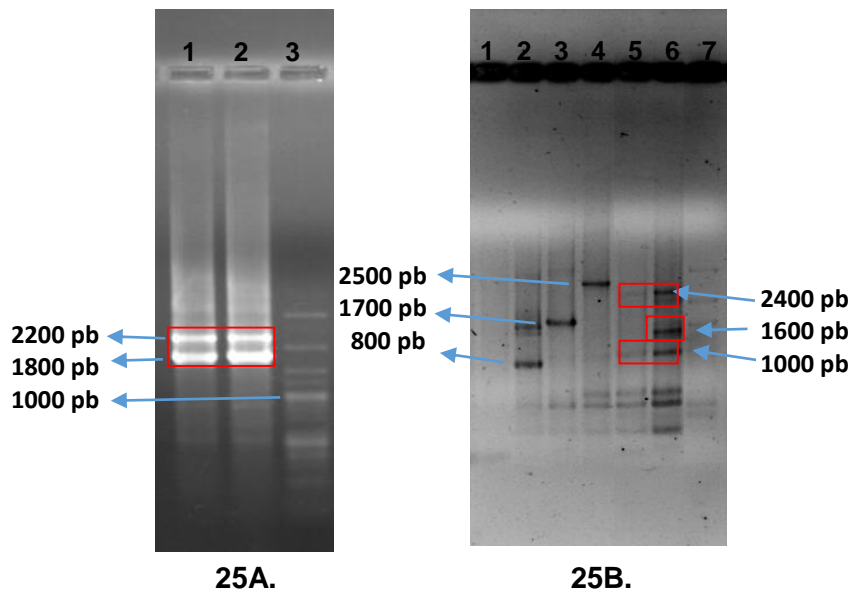


Fig. 25. Amplificación de la región variable de integrones clase 1. **Fig. 25A.** 1. BUAP360, 2. TCBUAP360-1, 3. Marcador de PM 100 pb plus. **Fig. 25B.** Carril 1: *E. coli* C600, carril 2: cepa C7204 de *E. coli*, carril 3: cepa C4433 de *E. coli*, carril 4: cepa C7722 de *E. coli*, carril 5: BUAP402, carril 6: BUAP433, carril 7: marcador de PM 100 pb plus.

RESUMEN DE RESULTADOS

Tabla 21. Resumen de resultados obtenidos en las cepas de *E. coli* y sus transconjugantes.

CEPA/(TC)	FILO GENIA	ST/CC	GENES BLA, BLEE/AmpCp	INC FII	INC FIB	INC FD	INC N	INC COLE	INC COL ETP	Inc I1	PM PLÁSMIDOS (kb)	OTROS GENES
BUAP253/ TcBUAP253-1	B2	ST1266	OXA-1 CTX-M-2	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-	-	n/d / n/d	int1,qac, sul1, tetA, tetB, cmlA
BUAP360 / TcBUAP360-1/ TcBUAP360-2	B1	ST155 CC155	CTX-M-1	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	n/d / 180, 110 /110	int1, qac, sul1, tetA, cmlA, sul3
BUAP382/ Tc382BUAP-1	B1	ST10 CC10	CMY-2	+/+	+/+	+/+	-	-	-	-	200, 120, 170	int1, qac, sul1, tetA, tetB, cmlA, sul3
BUAP402/TcB UAP402- 1/TcBUAP402- 2	B1	ST359 CC101	CMY-2	+/-	+/+	-	-	+/+	-	+/-	150, 120, 50 / 120 / 120	int1*, tetA, cmlA*, sul3*
BUAP433 / TcBUAP433-1	B1	ST617 CC10	CTX-M-1/CTX- M15, TEM 1b	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	n/d / 150, 130	int1, qac, sul1, tetA, tetB, cmlA, sul3
BUAP442/ TcBUAP442-1	D	ST501	CTX-M-2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	150, 130, 50 / nd	int1, qac, sul1, tetA, cmlA, sul3
BUAP426	B2	ST12 CC12	-	ND	-	ND	-	ND	ND	-	170, 120	-

*int1, cmlA, sul3 fueron detectados solamente en la cepa silvestre BUAP402

La presencia de los genes BLA, BLEE, AmpCp y otros genes fueron determinados a las transconjugantes en este estudio.

La presencia de los grupos de incompatibilidad y los pesos moleculares plasmídicos fueron determinados en este estudio.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó una caracterización molecular parcial de la transferencia de la multirresistencia en cepas de *E. coli* aisladas de carnes de cerdo y de pollo productoras de BLEE y AmpCp, las cuales poseen además de éstas enzimas, otros mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos tales como los genes *tetA* y *tetB*, así como los genes *cmlA*, *qac*, *sul1* y *sul3* asociados a integrones de clase 1. Se detectó resistencia a cefalosporinas de primera, segunda, tercera (CF, FOX, CAZ, CTX, CRO) y en algunos casos a cefalosporinas de cuarta generación (FEP) lo cual era de esperarse debido a la presencia de genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM} confirmados en estas cepas. Estos datos están en concordancia con otros trabajos publicados previamente en los que se reporta la presencia de estos genes en pollos y cerdos, además de prevalencias significativas de cepas resistentes a cefoxitina que son productoras de CMY-2. Los perfiles de resistencia de estas cepas exhibieron no solo un patrón de resistencia a betalactámicos como sucede en nuestras cepas de estudio, sino que también presentaron resistencia a otros antimicrobianos, de manera que su perfil de resistencia fue: AMP-CTX-CAZ-CTR-FLF-GEN-KAN-TET-CIP-OQX (Guo *et al.*, 2014). Por otro lado, Hiroi *et al.*, 2012, reportaron en pollos, la presencia de cepas productoras de *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{TEM}, lo cual concuerda con los resultados encontrados en este estudio, ya que también nuestras cepas presentaron estos genes, pero no así los genes *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-44} ni *bla*_{SHV-12}.

Otro estudio realizado en Alemania por Guerra *et al.*, 2003., detectó la presencia de cepas multirresistentes en pollos, cerdos y bovinos y en las que se identificaron genes que confieren resistencia a sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*) y cloranfenicol (*catA*, *cmlA*), los cuales son genes asociados con integrones de clase 1. Integrones de esta clase fueron reportados en ese mismo trabajo en un 30% de las muestras obtenidas. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio ya que nuestras cepas también poseen genes de resistencia sulfonamidas como *sul1* y *sul3*, genes de

resistencia a tetraciclinas *tetA* y *tetB*, así como los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{OXA-1}, así como la presencia de integrones clase 1.

No obstante debido a la co-resistencia que pudiera presentarse, es necesario que se realice en estas cepas, la detección de determinantes que confieren resistencia a otros antimicrobianos como a aminoglucosidos y quinolonas tales como la enzima AAC(6')-Ib-cr, las bombas de eflujo QepA y las bombas de eflujo OqxAB que también se han descrito en plásmidos de *E. coli* ya que estos aislados además de presentar resistencia a betalactámicos dada la presencia de BLEEs también presentaron resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.

Seis de siete de las cepas estudiadas en esta tesis, albergaron plásmidos que pudieron ser transferidos por conjugación a la cepa de *E. coli* C600. Sin embargo, en la cepa BUAP253 no se pudo detectar la presencia de este tipo de elementos genéticos móviles ni por el método de Kieser ni mediante el uso del kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen®, lo cual pudiera indicar que probablemente sea un plásmido integrado al cromosoma de la célula, es decir, un episoma. En estos casos, la conjugación también puede llevarse a cabo, mediando de esta manera un intercambio cromosomal debida a la integración de un plásmido autotransmisible en el cromosoma (Carattoli, 2001; Miljkovic-selimovic *et al.*, 2007) como ocurrió en el caso de la cepa BUAP253 en el cual a pesar de no observarse algún plásmido fue posible la obtención de transconjugantes.

Cabe mencionar que para la observación de los plásmidos se utilizaron diferentes métodos como lo son el método de Kieser, el de lisis alcalina y la utilización de un kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen®.

El método utilizado inicialmente fue la extracción por lisis alcalina que es utilizado para extracción de plásmidos de bajo peso molecular el cual es el método mayormente utilizado para el aislamiento de plásmidos a partir de cultivos bacterianos a pequeña escala (1-5 ml), mediante SDS y NaOH. La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas, y la liberación de los plásmidos, los cuales se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura superenrollada. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato potásico), provoca que se

cierre covalentemente el DNA plasmídico y la precipitación de las proteínas y la del DNA cromosómico (por reasociaciones aleatorias intracatenarias). Los agregados insolubles de proteínas y DNA cromosómico se separan por centrifugación del DNA plasmídico que quedará en el sobrenadante conservando mayoritariamente su estructura nativa.

Este método nos permitió observar de forma clara, plásmidos de bajo peso molecular aparente, que migraban hacia el frente del gel, y se observó la intensidad de las bandas de plásmidos de aparente peso molecular elevado con menor intensidad, de hecho, hubo cepas como en el caso de las BUAP360, BUAP382 y BUAP426 en las que no se observaron plásmidos inicialmente.

Debido a que no se observaban plásmidos en las cepas antes mencionadas y a obtención de muestras sucias con restos de proteínas se decidió utilizar el kit “QIAprep Spin Miniprep” que también está basado en la lisis alcalina de las bacterias. En éste método el lisado se neutraliza en presencia de una elevada concentración salina que favorece la adsorción del DNA. La elución del DNA plasmídico se realiza en una solución amortiguadora de baja concentración salina o en agua destilada, garantizando la purificación del DNA plasmídico, y la eliminación del DNA cromosómico, RNA, proteínas y otros metabolitos. Sin embargo, este sistema es para extraer plásmidos de alto número de copias, es decir de bajo peso molecular por bacteria, pudiendo procesar de 1-5 ml del cultivo bacteriano, por lo que si se pudieron obtener muestras más limpias pero también con menor concentración de DNA en ellas. Además, seguía sin observarse la presencia de estos elementos en las cepas ya mencionadas.

Finalmente se decidió utilizar el método de Kieser, el cual es utilizado para plásmidos de bajo número de copias (alto peso molecular) pudiendo procesar de más de 5 ml de cultivo bacteriano. Con este método se pudo observar la presencia de plásmidos en las cepas BUAP360, BUAP382 y BUAP426 lo cual confirma la eficiencia del método para la extracción de DNA plasmídico de alto peso molecular.

Debido a que no se conocía o poseía información del tipo de plásmidos que pudieran tener estas cepas, se utilizaron estos métodos tanto para extraer plásmidos de alto como de bajo peso molecular. Sin embargo, es necesario

desde el principio tener en cuenta el tipo de plásmidos que se esperan para saber que técnica utilizar y que tanto cultivo procesar, ya que los plásmidos de alto peso molecular, son de bajo número de copia y difícilmente serán visibles procesando un cultivo de 3 ml que es lo que normalmente se acostumbra procesar con los métodos de lisis alcalina, requiriendo procesar más cantidad del cultivo.

También es importante considerar el tiempo del cultivo bacteriano (lo ideal son cultivos de 12 y hasta 16 h, pero que no excedan de este tiempo) para no obtener muestras sucias con gran cantidad de metabolitos que puedan interferir en la obtención del DNA plasmídico. Por otro lado es importante darle las condiciones adecuadas de crecimiento a las células de aireación (150-200 rpm) en agitación y usando el medio adecuado para la bacteria de la que se desee obtener el plásmido.

Además, las bacterias deben inocularse a partir de colonias frescas, para evitar pérdida de plásmidos o mutaciones y también es importante mantener la presión del agente selectivo (antibiótico) cuando se cultiven las bacterias, sobre todo en el caso de las transconjugantes, para asegurar que no pierdan el plásmido, ya que de otro modo se podrían estar seleccionando bacterias sin plásmidos, que crecen mucho más rápidamente ya que no dedican energía a replicarlos. Igualmente sucedería si el antibiótico se ha degradado; por ello, es aconsejable almacenarlos congelados y añadirlos justo antes de utilizar el medio selectivo.

Los métodos de extracción de ADN plasmídico son relativamente sencillos, sin embargo necesitan de especial atención y cuidados durante la manipulación de los reactivos y el proceso de extracción en general.

En lo que respecta a los grupos de incompatibilidad detectados en los plásmidos portadores de genes de resistencia a antimicrobianos detectados en este trabajo, estos presentaron diferentes grupos de incompatibilidad. A seis de las siete cepas de *E. coli* de este estudio (BUAP253, BUAP360, BUAP382, BUAP402, BUAP433 y BUAP442), se les detectaron plásmidos pertenecientes a los grupos IncF asociados con la presencia de genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{OXA-}

1, *bla*_{TEM-1} lo que concuerda con resultados obtenidos en otros reportes de plásmidos portadores de genes de resistencia (Ruiz, 2012; Villa, *et al.*, 2010). También se detectó la presencia de un plásmido IncI1 en la cepa BUAP402 y plásmidos IncN en las cepas BUAP253, BUAP433 y BUAP442. Plásmidos del grupo de incompatibilidad InccolE fueron detectados en las cepas BUAP402, BUAP433 y BUAP442 asociados con la presencia de los genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CTX-M-1}, los cuales han sido reportados previamente por otros autores en animales y humanos, mientras que el grupo InccolETP fue detectado en plásmidos de las cepas BUAP433 y BUAP442 (Brouwer *et al.*, 2014; Hammerum *et al.*, 2014; Sallem *et al.*, 2014; Ruiz, 2012). Dichos trabajos reportan un incremento en la frecuencia de cepas productoras de BLEES y coinciden en que la transferencia de estas enzimas es mediada por plásmidos de estos grupos de incompatibilidad, asimismo, estos autores han reportado la dispersión de estas cepas productoras de BLEE de animales a humanos trabajadores de las granjas encargados del cuidado de estos animales.

Los plásmidos de tipo IncF son plásmidos de bajo número de copias y generalmente portan más de un replicón (Villa *et al.*, 2010), como hemos observado en nuestras cepas. En los plásmidos con multirreplicones, uno de ellos está muy conservado como consecuencia de la presión selectiva, mientras que el resto pueden sufrir variaciones que modifiquen y faciliten su compatibilidad con los replicones originales (Carattoli, 2009). En efecto, como se mencionó anteriormente, nuestras cepas albergaron varios plásmidos de tipo IncF (FIB, FII, F_D), lo que teóricamente sería imposible debido a su incompatibilidad. Sin embargo, como se explicó anteriormente, podría estar ocurriendo que un solo replicón esté siendo el encargado de la replicación, posibilitando así la coexistencia de todos ellos en la misma cepa. Los plásmidos de este grupo de incompatibilidad han sido muy asociados con la diseminación mundial del gen *bla*_{CTX-M-15} y otros determinantes de virulencia, por lo que Villa *et al.*, en 2010, propusieron un método para subcategorizar a esta familia de plásmidos tan heterogénea para contribuir en el análisis y seguimiento de la distribución de estos plásmidos de resistencia, el cual consiste en asignar un número de alelo a cada variante de los replicones tipo F presentes en el plásmido, de manera que dada la naturaleza multirreplicón de estos plásmidos

estos pueden ser identificados usando la fórmula FAB (FII, FIA, FIB). En este trabajo se determinó la fórmula FAB (F2:A-:B1) del plásmido transferido de la cepa BUAP360 a la TCBUAP360-1, dicha fórmula fue reportada en un plásmido de una *E. coli* patógena extraintestinal ExPEC pero que no poseía determinantes de resistencia del tipo betalactamasas.

El tipo de replicón IncN, también fue detectado en los plásmidos portadores de genes de resistencia en cepas de este estudio (BUAP253 BUAP433, BUAP442 y sus transconjugantes). Este grupo de incompatibilidad, es muy común en la microbiota fecal de animales (aves, cerdos) en *E. coli* y *Salmonella* (Villa *et al.*, 2010) por lo que la presencia de este tipo de replicón era de esperarse. Cabe mencionar que la transmisión entre cerdos y granjeros se ha demostrado en diferentes linajes de cepas de *E. coli*, lo cual es una prueba más de que la transmisión y dispersión de estas cepas multirresistentes entre animales y humanos se está llevando a cabo por la cercanía entre ellos y la inexistencia de cercos sanitarios en las granjas (Hammerum *et al.*, 2014; Moodley y Guardabassi, 2009).

El grupo de incompatibilidad Incl está asociado con la presencia de genes *bla*_{CMY-2} y *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-15} principalmente, tanto en aislados animales (de crianza y mascotas sanos o enfermos) como en cepas de humanos sanos y enfermos, lo cual indica una alta posibilidad de intercambio de cepas poseedoras de estos plásmidos ya sea vía animal-humano o viceversa y la diseminación de estos genes de resistencia en diversos ambientes (Hammerum *et al.* 2014, Sallem *et al.*, 2014; Haenni *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2014).

Por otro lado, los plásmidos de grupos de incompatibilidad InccolE e InccolETP detectados en este trabajo en las cepas BUAP402, BUAP433 y BUAP442 y sus transconjugantes, son de alto número de copias, autotransmisibles, que han sido asociados con la diseminación (aunque en un bajo número de reportes) de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en cepas de *Salmonella* principalmente y en menor número de *E. coli* de humanos tales como los *qnr*, *aph* y *aac(6')-Ib-cr* (Chen, *et al.*, 2010; de Toro *et al.*, 2013; Pallecchi *et al.*, 2010).

Las betalactamasas son uno de los principales mecanismos de resistencia existentes actualmente y como se puede observar, la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} asociado con la presencia de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad pone en evidencia la gran diseminación que ha sufrido en los últimos años, ya que a pesar de que ha sido muy asociada con la cepa de *E.coli* ST131 (Ewers *et al.*, 2010), la presencia de este gen en las cepas de este estudio se observó en otras secuencias tipo como las ST1266 (grupo filogenético B2), ST155 (grupo B1), ST10 (grupo B1), ST359 (grupo B1), ST617 (grupo B1) y ST501 (grupo D). También cabe mencionar que a pesar que el gen *bla*_{CTX-M-15} es altamente prevalente en humanos, los reportes de su incidencia en animales de crianza y en mascotas han ido en aumento, por ejemplo la clona ST617 fue reportada previamente en Francia en cepas de perros y gatos poseedoras del gen *bla*_{CTX-M-15} y resistentes además a aminoglucósidos, TE y TMP en un plásmido de fórmula F31:A4:B1 de aproximadamente 160 kb (Dahmen *et al.*, 2013), sin embargo, en este trabajo no se determinó la fórmula alélica del plásmido de esta cepa, por lo que sería interesante continuar con la caracterización del mismo para ver si hay una relación entre estos plásmidos. De manera similar, existen otros reportes de mascotas poseedoras de este gen en EUA y en el norte de Kenia (Albrechtova *et al.*, 2012; Shaheen *et al.*, 2011). Por otro lado, otras clonas cuyas secuencias tipo son también ST10, ST155 y ST359 fueron reportados por Guo *et al.*, en China en plásmidos IncK, IncA/C e IncFIB como portadoras de genes *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *oqxA*, *floR* y *aac-(6')-Ib-cr* (Guo *et al.*, 2014). Estos reportes, reflejan la gran dispersión a nivel mundial de distintos genes de resistencia y la posible complejidad de las rutas de transmisión involucradas.

Analizando los perfiles plasmídicos obtenidos en las cepas parentales seleccionadas y sus transconjugantes y para el caso de la cepa BUAP360 se observó la transferencia de 2 plásmidos IncF a la TCBUAP360-1, por el contrario solo se observó la transferencia de uno de estos plásmidos a la TCBUAP360-2, lo cual explica las diferencias observadas en el fenotipo de resistencia entre las 3 cepas. La cepa parental no transfirió dos resistencias (AN y NN) a la TCBUAP360-1, mientras que la TCBUAP360-2 solo adquirió resistencia a 7 de los 20 antibióticos probados en el antibiograma, lo cual podría estar indicando

que en el plásmido que pareciera de peso molecular más elevado que migró 17 mm en el gel observado en la TCBUAP-360-1 y la cepa parental BUAP360 es el responsable de contener los determinantes de resistencia al resto de los antibióticos. Por otro lado, de los 3 plásmidos observados en la cepa donadora BUAP402 que corrieron 19 mm, 22 mm y 31 mm en el gel, solamente se observó la transferencia del plásmido que corrió 22 mm a la TCBUAP402, lo cual puede explicar que solo se haya transferido la resistencia a tetraciclina, y que dicha resistencia este codificada en ese plásmido, cuyo grupo de incompatibilidad IncColE también se detectó en la transconjugante. Con respecto al perfil plasmídico de la cepa BUAP433 se observó la transferencia de un plásmido que migró 19 mm en el corrimiento electroforético, concordando con la transferencia de las resistencias a todos los antibióticos probados en el antibiograma así como de los genes de resistencia detectados mediante PCR tanto de grupos de incompatibilidad como *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B}.

Se sugiere que para hacer un análisis más preciso de los pesos moleculares de los plásmidos y no sea solo por comparación de la migración de las bandas se corten las bandas observadas en el gel y se corten con enzimas de restricción para linealizar el ADN y poder calcular el peso molecular de los plásmidos.

La adquisición de múltiples genes de resistencia a antimicrobianos a través de plásmidos e integrones ha permitido a las bacterias sobrevivir y prevalecer en diferentes ambientes, convirtiéndose en parte fundamental para su evolución (Mazel, 2006; Carattoli, 2001). Es precisamente, la presencia de integrones móviles, es decir, aquellos asociados con plásmidos y transposones que hacen posible su diseminación, lo que permite el incremento en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos previamente adquiridos o capturados por estos integrones (Marchant, *et al.*, 2013). Seis de siete cepas estudiadas en esta tesis, poseían de 1 a 3 integrones clase 1 lo que continua poniendo en evidencia la prevalencia tan elevada de este tipo de elementos genéticos móviles en *Escherichia coli*. Ninguna cepa presentó integrones clase 2 y todas las cepas amplificaron los genes de la región 3'(CS) (*qac* y *sul1*), además se detectó la presencia de los genes *cmIA* y *sul3* los cuales son asociados con la presencia de integrones defectivos; sin embargo, estos genes fueron detectados no solo en este tipo de integrones, sino también en aquellos de estructura clásica, a

excepción de la cepa BUAP253 que no amplificó el gen *sul3*. Este hecho resalta la gran capacidad de diseminación de estos genes en diferentes poblaciones y la alta eficiencia en sí de los propios integrones (Soufi *et al.*, 2011).

También se detectaron los genes de resistencia a tetracilina *tetA* y *tetB* los cuales son determinantes de resistencia más ampliamente distribuidos en *Enterobacteriaceae* y codifican bombas de expulsión activas para tetraciclina. Estos genes son normalmente localizados en transposones que a su vez están insertados dentro de plásmidos (Martí *et al.*, 2006) lo que les proporciona movilidad y les facilita la diseminación.

La asociación de una gran variedad de mecanismos de resistencia en un mismo elemento genético móvil como son plásmidos los convierte en peligrosas armas para las bacterias, ya que están contribuyendo a la transferencia y proliferación de genes de resistencia, e incluso acelerando la diseminación de la resistencia a antimicrobianos a humanos a través del consumo de carne contaminada debido a que muchos de los genes *bla_{BLEE}* y *bla_{AmpC}* identificados en este trabajo codificantes para las betalactamasas mencionadas anteriormente han sido detectados previamente no solamente en animales destinados para consumo humano sino también en aislados clínicos y mascotas como se mencionó anteriormente, lo que indica el uso general e indiscriminado de antimicrobianos, sobre todo el uso de cefalosporinas como un factor de riesgo importante que selecciona bacterias resistentes (Liebana *et al.*, 2013).

El uso de cefalosporinas de amplio espectro en pollos, cerdos y bovinos tales como el ceftiofur para promover el crecimiento o en tratamientos profilácticos, ha ido seleccionando bacterias resistentes a estos antimicrobianos, lo que aumenta el riesgo de infecciones humanas por bacterias productoras de BLEEs a través de carnes mal cocidas. Debido a esto, la implementación de controles exigentes es necesaria para limitar el uso de cefalosporinas en granjas dedicadas a la producción de este tipo de animales en primer instancia. Un ejemplo de esta medida, es la disminución de infecciones humanas por *Salmonella* y *E. coli* resistentes a ceftiofur debido al retiro de este antibiótico en los criaderos de pollo en Canadá (Guo *et al.*, 2014; Liebana *et al.*, 2013)

DISCUSIÓN

Aunque la expresión de BLEEs entre bacterias Gram negativas ha incrementado en México, este es el primer reporte en nuestro país de cepas de *E. coli* aisladas de alimentos cárnicos que almacenan genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2}, albergados en integrones de tipo 1 y que son acarreados en una plataforma plasmídica.

CONCLUSIONES

1. Las cepas de *E. coli* aisladas de productos cárnicos estudiadas en este trabajo presentaron alta resistencia a antibióticos betalactámicos, quinolonas, aminoglucósidos y otros.
2. La transferencia génica vía conjugación se llevó a cabo en 5 cepas de las 7 seleccionadas inicialmente.
3. La transferencia de la multirresistencia a antimicrobianos en este tipo de cepas fue mediada predominantemente por plásmidos del grupo de incompatibilidad F (IncF) en cepas productoras de CTX-M-1, CTX-M-15 y CTX-M-2; sin embargo, también se detectaron plásmidos IncN en cepas productoras de CTX-M-1 y CTX-M-2, así como también plásmidos IncI1 y Inc colE en cepas productoras de CMY-2 y TEM1b. Estos grupos de incompatibilidad fueron detectados en 6 cepas silvestres y 5 transconjugantes.
4. Los pesos moleculares de los plásmidos involucrados en la transferencia de la multirresistencia variaron entre 50 y hasta 200 kb.
5. Se detectó la presencia de integrones clase 1 en 6 de 7 cepas seleccionadas y la transferencia de genes asociados con este tipo de integrones tales como *qac*, *sul1*, *cmlA*, *sul3*, *tetA* y *tetB* se llevó a cabo en cinco de estas cepas de *E. coli* aisladas de alimentos.
6. Es el primer reporte en México de cepas de *E. coli* multidrogorresistentes aisladas de alimentos, productoras de betalactamasas plasmídicas.

PERSPECTIVAS

- Linearizar en ADN plasmídico para poder calcular el peso molecular de los plásmidos de las cepas estudiadas.
- Transformar algunos de los plásmidos encontrados para observar y adjudicar la resistencia a determinados antibióticos a cada uno de ellos.
- Secuenciar una región de algunos plásmidos para saber cuál es el plásmidos que está circulando en granjas y mataderos y así comparar con aquellos que han sido reportados en otros ambientes como los hospitales.
- Identificar las cepas de *E. coli* de origen alimentario con base en su mecanismo de patogenicidad (ETEC, EHEC, EIEC, EPEC, EAEC, DAEC).
- Volver a mandar a secuenciar la región variable de los integrones clase 1 ya que debido a que las secuencias de estas regiones suelen salir sucias no fue posible determinar los genes que están presentes en las RV de las cepas seleccionadas.
- Amplificar otros genes que confieren resistencia a aminoglicosidos y quinolonas tales como la enzima AAC(6')-Ib-cr o las bombas de eflujo QepA o las bombas de eflujo OqxAB que también se han descrito en plásmidos de *E. coli*.
- Conocer el entorno genético de los genes de betalactamasas encontrados (mapeo de los integrones presentes en estas cepas).
- Realizar más estudios con cepas de origen alimentario para conocer la situación actual de la multidrogresistencia en estos ambientes ya que este es el primer reporte de multirresistencia a antibióticos en este tipo de aislados.
- Trabajar de manera integral y permanente con las Instituciones de salubridad de granjas a fin de crear programas de vigilancia epidemiológica en resistencia bacteriana, con el objetivo de controlar la propagación de la resistencia a antimicrobianos.

REFERENCIAS

- Albrechtova, K., Dolejska, M., Cizek, A., Tausova, D., Klimes, J., Bebora, L., y Literak, I. (2012). Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 4013–7. doi:10.1128/AAC.05859-11
- Ambler, R.P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences of London*. 289, 321-331.
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M.M., Vedel, G., Nénot, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G. (1994). Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Lett.* 120, 75-80.
- Ben Slama K, Jouini A, Ben Sallem R, Somalo S, Sáenz Y, Estepa V, Boudabous A, Torres C (2010). Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *International Journal of Food Microbiology* 281–286 2009
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B, Porres-Osante N, Jouini A, Klibi N, Boudabous A, Sáenz Y, Torres C. (2014). IncI1 Plasmids Carrying bla_{CTX-M-1} or bla_{CMY-2} Genes in *Escherichia coli* from Healthy Humans and Animals in Tunisia. *Microbial Drug Resistance*. 20(5):495-500. doi: 10.1089/mdr.2013.0224.
- Brouwer, M. S. M., Bossers, A., Harders, F., Essen-zandbergen, A. Van, Mevius, D. J., Smith, H. E. (2014). Complete Genome Sequences of IncI1 Plasmids Carrying Extended-Spectrum β -Lactamase Genes. *Genome Announcements* 2(4), 1–2. doi:10.1128/genomeA.00859-14

REFERENCIAS

- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39, 1211-1233.
- Carattoli, A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance, *Veterinary Research* 32, 243–259.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–38. doi:10.1128/AAC.01707-08
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
- Chen, C.-Y., Lindsey, R. L., Strobaugh, T. P., Frye, J. G., & Meinersmann, R. J. (2010). Prevalence of ColE1-like plasmids and kanamycin resistance genes in *Salmonella enterica* serovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6707–14. doi:10.1128/AEM.00692-10
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., Maas, W.K. (1988). Identification. And classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews* 52, 375-395.
- Croxen, M. a, & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(1), 26–38. doi:10.1038/nrmicro2265
- Dahmen, S., Haenni, M., Châtre, P., & Madec, J.-Y. (2013). Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(12), 2797–801. doi:10.1093/jac/dkt291
- De Toro, M., Rodríguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Torres, C., Guerra, B., & Sáenz, Y. (2013). pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac*(6′)-Ib-cr gene in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

REFERENCIAS

- The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(6), 1277–80.
doi:10.1093/jac/dkt001
- Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P. a, Diehl, I., Semmler, T., Guenther, S. (2010). Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4), 651–60. doi:10.1093/jac/dkq004
- Fischer J., Rodríguez I., Baumann B., Guiral E., Beutin L., Schroeter A., Kaesbohrer A., Pfeifer Y., Helmuth R., Guerra B. (2014). *bla*_{CTX-M-15}-carrying *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from livestock and food in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(11):2951-8. doi: 10.1093/jac/dku270.
- García-Fernández, A., Fortini, D., Veldman, K., Mevius, D. y Carattoli, A. (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 274–81. doi:10.1093/jac/dkn470
- Giske, C.G., Sundsfjord, A.S., Kahlmeter, G., Woodford, N., Nordmann, P., Paterson, D.L., Cantón, R., Walsh, T.R. (2009). Redefining extended spectrum beta- lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63, 1-4.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT. (2000). An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. W. H. Freeman and Company. 7th edition. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21851/>
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E., Dalsgaard, A. (2000). Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology* 49, 929-936.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., & Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial

REFERENCIAS

- resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 489–92. doi:10.1093/jac/dkg362
- Guo, Y.-F., Zhang, W.-H., Ren, S.-Q., Yang, L., Lü, D.-H., Zeng, Z.-L., Jiang, H.-X. (2014). IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PloS One*, 9(5), e96738. doi:10.1371/journal.pone.0096738
- Haenni M., Saras E., Métayer V., Médaille C., Madec J. Y. (2014). High prevalence of *bla*_{CTX-M-1/IncI1/ST3} and *bla*_{CMY-2/IncI1/ST2} plasmids in healthy urban dogs in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014 Sep;58(9):5358-62. doi: 10.1128/AAC.02545-14.
- Hammerum A.M, Larsen J., Andersen V.D, Lester C.H, Skovgaard Skytte T.S, Hansen F., Olsen S.S, Mordhorst H., Skov R.L, Aarestrup F.M, Agersø Y. (2014). Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oct;69(10):2650-7. doi: 10.1093/jac/dku180.
- Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Ohashi, N. (2012). Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), 189–195. doi:10.1292/jvms.11-0372
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T. and Yamaguchi, K. (2005). Extended Spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 3533–3537.

REFERENCIAS

- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A.-P., Mevius, D., ... Threlfall, J. (2013). Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(7), 1030–7. doi:10.1093/cid/cis1043
- Lorenzo-Díaz, L. F. (2010). Interacciones moleculares en la transferencia conjugativa del plásmido pmv158. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Marchant, M., Vinué, L., Torres, C., & Moreno, M. a. (2013). Change of integrons over time in *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pigs and chickens. *Veterinary Microbiology*, 163(1-2), 124–32. doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.011
- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., ... Vila, J. (2006). Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), 77–80. doi:10.1157/13085012
- Martínez-Martínez, L., Calvo, J. (2010). Development of resistances to antibiotic drugs: causes, consequences and importance to the public health system. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28, 4-9.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*. 4, 608- 620.
- Miljkovic-selimovic, B., Babic, T., Kocic, B., Stojanovic, P., Ristic, L., & Dinic, M. (2007). Review article, (2), 61–65.
- Moodley, A., & Guardabassi, L. (2009). Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers.

REFERENCIAS

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1709–11.
doi:10.1128/AAC.01014-08
- Pallecchi, L., Riccobono, E., Sennati, S., Mantella, A., Bartalesi, F., Trigoso, C., Rossolini, G. M. (2010). Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the *qnrB19* gene in commensal enterobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 678–82.
doi:10.1128/AAC.01160-09
- Perreten, V., Boerlin, P. (2003). A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47, 1169-1172.
- Philippon, L. N., Naas, T., Bouthors, A., Barakett, V., & Nordmann, P. (1997). OXA-18 , a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* . OXA-18 , a Class D Clavulanic Acid-Inhibited Extended-Spectrum β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*.
- Rankin, D. J., Rocha, E. P. C., & Brown, S. P. (2011). What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity*, 106(1), 1–10.
doi:10.1038/hdy.2010.24
- Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios-Hernández, J. M., Torres, C. (2010). Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(1), 169–71. doi:10.1093/jac/dkp418
- Ruiz, B., Vinué, L., Román, E. J., Guerra, B., Carattoli, A., Torres, C., & Martínez-martínez, L. (2013). Molecular characterization of multiresistant *Escherichia coli* producing or not extended-spectrum β -lactamases.

REFERENCIAS

- Ruiz, E. (2012). Detección, entornos genéticos, localización y expresión de genes adquiridos de resistencia a quinolonas en *Enterobacteriaceae*. Tesis Doctoral-Universidad de La Rioja, España.
- Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C. (2010). Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Veterinary Microbiology* 26, 493-497.
- Sarria-Guzmán, Y., López-Ramírez, M. P., Chávez-Romero, Y., Ruiz-Romero, E., Dendooven, L., & Bello-López, J. M. (2014). Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas spp.* strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Current Microbiology*, 68(5), 581–6. doi:10.1007/s00284-013-0511-6
- Shaheen, B. W., Nayak, R., Foley, S. L., Kweon, O., Deck, J., Park, M., Boothe, D. M. (2011). Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5666–75. doi:10.1128/AAC.00656-11
- Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y., & Arakawa, Y. (2004). *Escherichia coli* Producing CTX-M-2 β -Lactamase in Cattle, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 69–75. doi:10.3201/eid1001.030219
- Silva-Sánchez, J., Cruz-Trujillo, E., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Sánchez-Pérez, A., & Garza-Ramos, U. (2013). Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PloS One*, 8(10), e77968. doi:10.1371/journal.pone.0077968
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M. S., Ruiz, E., Zarazaga, M., Torres, C. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 497–502. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.008

REFERENCIAS

- Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J.E. Jr. Tenover, F.C. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2864- 2872
- Suárez, C., Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27, 116-129.
- Valentin, L., Sharp, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., Käsbohrer, A. (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 304(7), 805–816. doi:10.1016/j.ijmm.2014.07.015
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518–2529. doi:10.1093/jac/dkq347
- Wagner, A. 2006. Cooperation is fleeting in the world of transposable elements. *PLoS Computational Biology*. Volume: 2 Pages: 1522-1529
- Wang J, Stephan R, Power K, Yan Q, Hächler H. (2014). Nucleotide sequences of 16 transmissible plasmids identified in nine multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates expressing an ESBL phenotype isolated from food-producing animals and healthy humans. 69(10):2658-68. doi: 10.1093/jac/dku206.

Referencias obtenidas de internet:

www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&id=811

Panamerican Health Organization – México

www.who.int/features/factfiles/food_safety/es/

World Health Organization

www.who.int/foodsafety/publications/consumer/manual_keys_es.pdf

Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos

A N E X O S

I. MEDIOS DE CULTIVO

- **Preparación del caldo Luria-Bertani (LB) modificado por litro.**

- Peptona de caseína 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Glucosa anhidra 2 g

Se le agregó la cantidad de antibiótico necesaria para cada concentración determinada.

II. PREPARACIÓN DE STOCKS DE ANTIBIÓTICOS

- **Cefotaxima a 10,000 µg/ml**

- Solución de Cefotaxima (1 g/10 mL)
- Cefotaxima sal disódica 1 g
- Agua inyectable estéril 10 mL

Se pesó el antibiótico en condiciones de esterilidad, se agregó el volumen de agua inyectable estéril con una jeringa o pipeta estéril y se realizaron alicuotas en tubos "ependorf". Se guardaron y mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

- **Rifampicina a 30,000 µg/ml**

- 1 cápsula de rifampicina de 0.3 g
- 10 ml de metanol puro

Se agregó el contenido de la cápsula a los 10 ml de metanol dentro de un tubo falcon y se agitó hasta disolver.

- **Ciprofloxacino a 50,000 µg/ml**

- 1 pastilla de ciprofloxacino de 0.5 g
- 10 ml de agua inyectable estéril

Se trituró la pastilla en un mortero estéril y se disolvió con el agua para posteriormente almacenarla en un tubo falcon estéril a -20°C hasta su uso.

III. SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN PLASMÍDICA POR MÉTODO DE KIESER

- **Solución 1 de Kieser**
- Sacarosa 0.3 M (15ml)
- Tris-HCl 25mM-pH 8 (1.25 ml)
- EDTA 25-mM pH 8 (2.5ml)
- H₂O (31.25 ml)
- **Solución 2 de Kieser**
- NaOH 5M (300 ul)
- SDS 10% (1 ml)
- H₂O (3.7 ml)

IV. Extracción plasmídica con el kit Qiaprep Spin Miniprep de Qiagen®

1. Se inoculó una colonia de la cepa de interés en 20 ml de caldo LB y se incubó por 16 horas a 37°C.
2. Se centrifugaron 3 ml del cultivo a 13 000 rpm y se eliminó el sobrenadante cuidando que el precipitado quedara con la menor cantidad de medio posible.
3. Posteriormente se resuspendió el precipitado en 250 µl del buffer P1 (anexo).
4. Se agregaron 250 µl del buffer P2 y se mezcló suavemente por inversión hasta que la solución se tornó azul.
5. Se agregaron 350 µl del buffer N3 y se mezcló inmediata y vigorosamente.
6. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 13,000 rpm y el sobrenadante se recuperó en una columna por decantación.
7. Se centrifugó de nuevo a 13,000 durante un minuto y se decantó el sobrenadante.
8. La columna se lavó con 500 µl de buffer PB, se centrifugó 1 minuto y se volvió a decantar.
9. Se agregaron 750 µl del buffer PE, se centrifugó y se decantó.
10. Se volvió a centrifugar 1 minuto para eliminar residuos del buffer anterior y la columna se colocó en un eppendorf nuevo.

11. Se agregaron 50 µl de agua inyectable estéril para eluir el ADN. Se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó de 30-60 segundos.

V. SECUENCIACIÓN DE GENES DETECTADOS

- Genes *bla*

1. *bla*_{CTX-M-1 TC-1 BUAP360}

GTCAGTTACGCTGATGGCGACGGTCAGTTACGCTGATGGCGACGGCACGTCACGCTGTTGTTAGGAA
 GTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAG
 GAAGACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCT
 TTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGA
 ATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGC
 ACGTCGATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGA
 TGAATAAGCTGATTTCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACG
 AAACGTTCCGCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATACCA
 CTTACCTCGGGCAATGGCGCAAATCTGCGTAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGTGACAGCCAAC
 GGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCAGGCTGGACTGCCTG
 CTTCTTGGGTTGTGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCACCACCAACGATATCGCG

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli strain 63743 plasmid pEQ2, complete sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	KF362122.2
Escherichia coli strain T23 plasmid pEQ1, complete sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	KF362121.2
Escherichia coli strain B3804 plasmid pIFM3804, complete sequence	1345	1345	100%	0.0	99%	KF787110.1
Escherichia coli strain Uqd59 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-138 (blaCTX-M-138) gene, partial cds	1345	1345	100%	0.0	99%	KF526119.1
Escherichia coli plasmid pCTX2412 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 2412	1345	1345	100%	0.0	99%	HF549091.1
Escherichia coli plasmid pCTX1261 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 1261	1345	1345	100%	0.0	99%	HF549090.1
Escherichia coli plasmid pCTX4145 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 4145	1345	1345	100%	0.0	99%	HF549089.1
Escherichia coli plasmid pCTX1956 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 1956	1345	1345	100%	0.0	99%	HF549088.1

• Alineamiento nucleotídico

```

CTXM1          -----GCA--CGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGT 35
CTXM-1TC360   GTCAGTTACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGT 60
                ***  *****

CTXM1          ATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAA 95
CTXM-1TC360   ATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAAACCTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGAA 120
                *****

CTXM1          GACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCT-GAT 154
CTXM-1TC360   GACTGGGTGTGGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTTGTAT 180
                *****

CTXM1          GAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAA 214
CTXM-1TC360   GAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGTGGCCGCGGTGCTGAAGAAA 240
                *****

CTXM1          AGTGAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACTTGGTT 274
CTXM-1TC360   AGTGAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACTTGGTT 300
                *****

CTXM1          AACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCAGCTCGATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGC 334
CTXM-1TC360   AACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCAGCTCGATGGGACGATGTCACCTGGCTGAGCTTAGC 360
                *****

CTXM1          GCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTTCTCACGTTGGC 394
CTXM-1TC360   GCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTTCTCACGTTGGC 420
                *****

CTXM1          GGCCCGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGAC 454
    
```

```

CTXM-1TC360      GGGCCGGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGAC 480
                  *****

CTXM1            CGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCT 514
CTXM-1TC360     CGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCT 540
                  *****

CTXM1            CGGGCAATGGCGCCAAACTCTGCGTAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGTGACAGCCA 574
CTXM-1TC360     CGGGCAATGGCG-CAAACCTGCGTAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGGTGACAGCCA 599
                  *****

CTXM1            ACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATA----- 609
CTXM-1TC360     ACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCAGGC 659
                  *****

CTXM1            -----
CTXM-1TC360     TGGACTGCCTTCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAAACCGGCAGCGGTGACTATGGCACCAC 719

CTXM1            -----
CTXM-1TC360     CAACGATATCGCG 732
    
```

- **Alineamiento aminoacídico**

```

CTX-M-1_TCBUAP360  QFTLMATVSSR-WRRHVTLLLGSVPLYAQTADVQQKLAELERQSGGRLGVALINTADNSQ 59
CTXM1_BLAST       -----

CTX-M-1_TCBUAP360  ILYRADERFAMCSTSKVMAVAVLKKESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVDGTM 119
CTXM1_BLAST       -----HVDGTM 6
                  *****

CTX-M-1_TCBUAP360  SLAELSAALQYSDNVAMNKLI SHVGGPASVTAFAARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP 179
CTXM1_BLAST       SLAELSAALQYSDNVAMNKLI SHVGGPASVTAFAARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDP 66
                  *****

CTX-M-1_TCBUAP360  RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVDKGTGS 239
CTXM1_BLAST       RDTTSPRAMAQTLRNLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGN----- 103
                  *****

CTX-M-1_TCBUAP360  GDYGTNDIA 249
CTXM1_BLAST       -----
    
```

2. *bla*_{TEM-1B} TC-1 BUAP433

```

GGTTATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
GAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACC
CTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTTCGTGTGCGC
CTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAG
TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
CTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACT
ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC
AGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTG
ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTC
GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGAT
GCCTGCAGCAATGGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
    
```

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae plasmid pRMH760, complete sequence	1463	1463	100%	0.0	99%	KF976462.2
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain ST540, complete genome	1463	1463	100%	0.0	99%	CP007391.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain ECN580 plasmid pECN580, complete sequence	1463	1743	100%	0.0	99%	KF914891.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae ATCC BAA-2146 plasmid pHo, complete sequence	1463	1789	100%	0.0	99%	CP006862.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain NMI5428/11 plasmid pMC-NDM, complete sequence	1463	1463	100%	0.0	99%	HG003895.1

• **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

temlbtipo      -----
TEM1B433      GGTTATGTCATGATAAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTG 60

temlbtipo      -----
TEM1B433      CGCGGAACCCCTATTGTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGA 120

temlbtipo      -----ATGAGTATTCAACAT 15
TEM1B433      CAATAACCCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACAT 180
                *****

temlbtipo      TTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTGTGTTTTGCTCACCCA 75
TEM1B433      TTTCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTTCTGTGTTTTGCTCACCCA 240
                *****

temlbtipo      GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC 135
TEM1B433      GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC 300
                *****

temlbtipo      GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAGAACGTTTTTCCA 195
TEM1B433      GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAGAACGTTTTTCCA 360
                *****

temlbtipo      ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGG 255
TEM1B433      ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGG 420
                *****

temlbtipo      CAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCA 315
TEM1B433      CAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCA 480
                *****

temlbtipo      GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATA 375
TEM1B433      GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATA 540
                *****

temlbtipo      ACCATGAGTGATAAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 435
TEM1B433      ACCATGAGTGATAAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG 600
                *****

temlbtipo      CTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG 495
TEM1B433      CTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG 660
                *****

temlbtipo      GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGG-C 554
TEM1B433      GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGGC 720
                *****

temlbtipo      AACAACGTTGCGCAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATT 614
TEM1B433      AACAACGTTGCGCAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATT 780
                *****

temlbtipo      AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC 674
TEM1B433      AATAGACTGGATGGAGGCGGATAA-----T-----T-----T-----T----- 804
                *****

temlbtipo      TGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCG 734
TEM1B433      -----
    
```

```

temlbtipo      AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCA 794
TEM1B433      -----

temlbtipo      GGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA 854
TEM1B433      -----

temlbtipo      TTGGTAA 861

```

- **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

TEMB1B_TCBUAP433  W-MLQ-Y-KRKSMSIQHFRVALIPFFAAFCPLVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELD 57
TEMTIPO1B        -----MSIQHFRVALIPFFAAFCPLVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGYIELD 48
                  *****

TEMB1B_TCBUAP433  LNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTE 117
TEMTIPO1B        LNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVEYSPVTE 108
                  *****

TEMB1B_TCBUAP433  KHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDREPELN 177
TEMTIPO1B        KHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTIGGPKELTAFLNMGDHSVTRLDREPELN 168
                  *****

TEMB1B_TCBUAP433  EAIPNDERDTMPAAMGNVAQTINWRRTYSSFPATINRLDGGG- 221
TEMTIPO1B        EAIPNDERDTMPAAMGNVAQTINWRRTYSSFPATINRLDGGG- 212
                  *****

```

3. *bla*_{CTX-M-15} TC-1 BUAP433

TTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCCTGGCTGAGCTTAGCGCG
 GCCGCGCTGCAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAG
 CGTCACCGCGTTCGCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAA
 ACACCGCCATTCGGGGCGATCCGCGTGATAACCACTTACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATC
 TGACGCTGGGTAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATAC
 CACCGGTGCAGCGAGCATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCG
 GTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTC
 ACTTACTTCA

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNIH31, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP009876.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain ECONIH1 plasmid pECO-824, complete sequence	893	893	100%	0.0	99%	CP009860.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain ECONIH1, complete genome	893	893	100%	0.0	99%	CP009859.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia sp. ESBL490B15_13_4E beta-lactamase (blaCTX-M) gene, partial cds	893	893	100%	0.0	99%	KM507817.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia sp. ESBL370B15_13_2A beta-lactamase (blaCTX-M) gene, partial cds	893	893	100%	0.0	99%	KM507810.1
<input type="checkbox"/>	Escherichia sp. ESBL360aB15_13_3F beta-lactamase (blaCTX-M) gene, partial cds	893	893	100%	0.0	99%	KM507809.1

- **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

CTX-M-15      -----
CTXM15      GCAACCGTCACGCTGTTGTTAGGAAGTGTGCCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAG 60

CTX-M-15      -----
CTXM15      CAAAACTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAAC 120

```

CTX-M-15 -----
 CTXM15 ACAGCAGATAAATTCGCAAATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTGCGATGTCAGCACC 180

CTX-M-15 -----
 CTXM15 AGTAAAGTGATGGCCGCGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTTA 240

CTX-M-15 -----TTGTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAG 29
 CTXM15 AATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAG 300

CTX-M-15 CACGTCAATGGGACGATGTCTACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTGCAGTACAGCGAT 89
 CTXM15 CACGTCAATGGGACGATGTCTACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCGCTGCAGTACAGCGAT 360

CTX-M-15 AACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGTAGCGTCACCGCGTTC 149
 CTXM15 AACGTGGCGATGAATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGTAGCGTCACCGCGTTC 420

CTX-M-15 GCCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACC 209
 CTXM15 GCCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGCTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACC 480

CTX-M-15 GCCATTCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGG 269
 CTXM15 GCCATTCGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGG 540

CTX-M-15 AATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGCGCAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATG 329
 CTXM15 AATCTGACGCTGGGTAAAGCATTTGGCGCAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATG 600

CTX-M-15 AAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTACAGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTG 389
 CTXM15 AAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTACAGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTG 660

CTX-M-15 GGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCA 449
 CTXM15 GGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCA 720

CTX-M-15 AAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCA----- 486
 CTXM15 AAAGATCGTGCGCCGCTGATTCTGGTCACTTACTTCAACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAA 780

CTX-M-15 -----
 CTXM15 AGCCGTCGCGATGTATTAGCGTCGGCGGCTAAATCGTCAC 820

• **Alineamiento aminoacídico**

CTX-M-15 TC433 -----
 CTX-M-BLAST ATVTLLLSVPLYAQTADVQOKLAELEFRQSGGRLGVALINTADNSQILYRADERFAMCST 60

CTX-M-15_TC433 -----VNYNPIAEKHVNGTMSLAELSAAALQYSD 29
 CTX-M-BLAST SKVMAAAVALKKSESEPNLLNQRVEIKKSDLVNYNPIAEKHVNGTMSLAELSAAALQYSD 120

CTX-M-15_TC433 NVAMNKLIAHVGGPASVTAFAARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTTSPRAMAQTLR 89
 CTX-M-BLAST NVAMNKLIAHVGGPASVTAFAARQLGDETFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTTSPRAMAQTLR 180

CTX-M-15 TC433 NLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTSGSGYGTTNDIAVIWP 149
 CTX-M-BLAST NLTLGKALGDSQRAQLVTWMKGNTTGAASIQAGLPASWVVGDKTSGSGYGTTNDIAVIWP 240

CTX-M-15 TC433 KDRAPLILVTYF----- 161
 CTX-M-BLAST KDRAPLILVTYFTQPQKAESRRDVLASAAKSS 273

- Grupos de incompatibilidad.

- INC FIB TC1-BUAP360

```
CCCACAGGCTGGAGGCTTTCTGGAAGGAGGAAAAATTCAGACATCAAAAAACTGTTCGGCGAGGTGGATAAG
TCCTCCGGTGAGCTGGTGACACTGACACCAAACAATAACAACACCGTACAACCTGTGGCGCTGATGCGT
CTGGGCGTTTTTGTACCGACCCCTTAAATCACTGAAGAACAGTAAAAAAAATACACTGTCACGTACTGAT
GCCACGGAAGAGCTGACACGTCTTTCCCTGGCCCCGTGCTGAGGGATTCGATAAGGTTGAGATCACCGGC
CCCCGCCTGGATATGGATAATGATTTCAAGACCTGGGTGGGGATCATTTCATTCCTTTGCCCGCCATAAC
GTGATTGGTGACAAAGTTGAACTGCCTTTTGTGAGTTTGCAAAACTGTGTGGTATACCTTCAAGCCAG
TCATCCCGCAGGCTGCGTGAGCGCATCAGCCCTTCCCTGAAGCGCATTGCCGGTACCGTGATTTTCGTTT
TCCCGTACCGATGAGAAGCACACCCGGGAATATATACCCATCTGGTACAGTCAGCTTACTACGATACT
GAGCGGGATATTGTGCAGTTACAGGCCGAT
```

1 exact match found.

[Translate query](#)

Allele	Length	Start position	End position
FIB: 1	373	35	407

Allele information - FIB: 1

Provenance/meta data

locus: FIB
 allele: 1

sequences: ATTCAGACAT CAAAAACTG TTGGCGAGG TGGATAAGTC CTCGGGTAG CTGGTGACAC TGACACCAA CAATAACAAC ACCGTACAAC CTGTGGCGCTG ATGGCGCTG GCGTTTTTGG TACCGACCCCT
 TAAATCACTG AAGAACAGTA AAAAAAATAC ACTGTCACTG ACTGATGCCA CCGAAGAGCT GACACGTCTT TCCCTGGCCC GTGCTGAGGG ATTGGATAAG GTTGAGATCA CCGCCCCCGG CCTGGATATG
 GATAATGATT TCAAGACCTG GGTGGGGATC ATTCACTCTT TTGCCCCGCA TAACGTGATT GGTGACAAAG TTGAACCTGCC TTTTGTGAG TTTGCAAAAC TGTGTGGTAT ACC

length: 373
 status: Sanger trace checked
 date entered: 2010-09-10
 datestamp: 2010-09-10
 sender: Alessandra Carattoli
 curator: Alessandra Carattoli, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy (E-mail: alessandra.carattoli@iss.it)

Accession (1)

Genbank: AJ851089

BLASTN Search Result

Database: genes-nt

DNA sequence database entries related to query - 105 hits

[Show alignment](#)

Entry	bits	E-val
<input checked="" type="checkbox"/> sem:STMDT12_C38690 replication protein A	1088	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> eln:NRG857_30273 repFIB; replication initiator protein RepFIB	1088	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> ecz:pECS88_0002 repA; RepFIB replication protein RepA	1088	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> ecm:EcSMS35_A0095 repA; repFIB replication protein A	1088	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> ecv:APEC01_01CoBM186 repA; hypothetical protein	1074	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> ecy:ECSE_F3-0012 replication protein RepA	1056	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> eun:UMNK88_pEnt16 repA; RepFIB replication protein RepA	1052	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> elx:CDC0157_A0026 repA; replication protein RepA	1016	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> etw:ECSP_6026 replication protein	1016	0.0
<input checked="" type="checkbox"/> ecf:ECH74115_B0026 initiator RepB protein	1016	0.0

>sem:STHD12_C38690 replication protein A
Length=978
Score = 942 bits (1044), Expect = 0.0
Identities = 522/522 (100%), Gaps = 0/522 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 64 GTGGATAAGTCTCCGGT...
Sbjct 1 GTGGATAAGTCTCCGGT...

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium
T000240: STMD12_C38690
Entry: STHD12_C38690 CDS T01742
Definition: replication protein A
Organism: sem Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium T000240
SSDB: Ortholog Paralogs Gene cluster GFIT
Motif: Pfam: Rep_3
Other DBs: NCBI-GI: 37898489
NCBI-geneID: 11842802
NITE: STHD12_C38690
Position: 4032284..4032261
Genome map
AA seq: 325 aa AA seq DB search
NT seq: 978 nt nt +upstream nt +downstream nt

REPA_BLAST FIBTC360 -----
CCCACAGGCTGGAGGCTTTCTGGAAGGAGGAAAAATTCAGACATCAAAAAACGTTCGGC 60
REPA_BLAST FIBTC360 ---GTGGATAAGTCTCCGGT...
GAGGTGGATAAGTCTCCGGT... 120
REPA_BLAST FIBTC360 CAACCTGTGGCGCTGATGCGTCTGGCGT...
CAACCTGTGGCGCTGATGCGTCTGGCGT... 180
REPA_BLAST FIBTC360 AGTAAAAAAAATACACTGTACGTA...
AGTAAAAAAAATACACTGTACGTA... 240
REPA_BLAST FIBTC360 GCCCGTGCTGAGGGATTCGATA...
GCCCGTGCTGAGGGATTCGATA... 300
REPA_BLAST FIBTC360 GATTTCAAGACCTGGGTGGGGAT...
GATTTCAAGACCTGGGTGGGGAT... 360
REPA_BLAST FIBTC360 AAAGTTGAAGTGCCTTTTGT...
AAAGTTGAAGTGCCTTTTGT... 420
REPA_BLAST FIBTC360 TCCCGCAGGCTGCGTGAGCGCAT...
TCCCGCAGGCTGCGTGAGCGCAT... 480
REPA_BLAST FIBTC360 TCGTTTTCCCGTACCGATGAGA...
TCGTTTTCCCGTACCGATGAGA... 540
REPA_BLAST FIBTC360 GCTTACTACGATACTGAGCGGGAT...
GCTTACTACGATACTGAGCGGGAT... 585
REPA_BLAST FIBTC360 CTGTACCAGTTTGACAGAAAAGT...
CTGTACCAGTTTGACAGAAAAGT... 597
REPA_BLAST FIBTC360 CGGGAGTCCGCCAGGCACTTAC...
CGGGAGTCCGCCAGGCACTTAC... 657
REPA_BLAST FIBTC360 ATATCGCTGGCGGGCTGCGTGC...
ATATCGCTGGCGGGCTGCGTGC... 717

```

REPA_BLAST      CAGACGGTCAGACGGGCAATGGAGCAGTTGCGCGAGATTGGATATCTTGATTACACGGAG 777
FIBTC360      -----

REPA_BLAST      ATCCAGCGGGGGCGGACAAAATTCTTCTGTATTTACTACCGGCGTCCCCGGTTAAAAGCG 837
FIBTC360      -----

REPA_BLAST      CCGAATGACGAGAGTAAGGAAAATCCGTTGCAACCTTCACCTGCGGAAAAAGTCAGTCCG 897
FIBTC360      -----

REPA_BLAST      GAGATGGCGGAGAAGCTTGCCCTGCTTGAGAACTGGGCATCACGCTGGATGACCTGGAA 957
FIBTC360      -----

REPA_BLAST      AAACTCTTCAAATCCCGCTGA 978
FIBTC360      -----

```

- **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

FIBTC360      PTGWRLSGRRKNSDIKKLFGEVDKSSGELVTLTPNNNNTVQPVALMRLGVFVPTLKS LKN 60
REPA_BLAST    -----VDKSSGELVTLTPNNNNTVQPVALMRLGVFVPTLKS LKN 39
                *****

FIBTC360      SKKNTLSRTDATEELTRLSLARAEGFDKVEITGPRLDMDNDFKTWVGI IHSFARHN VIGD 120
REPA_BLAST    SKKNTLSRTDATEELTRLSLARAEGFDKVEITGPRLDMDNDFKTWVGI IHSFARHN VIGD 99
                *****

FIBTC360      KVELPFVEFAKLCGIPSSQSSRRLRERISPSLKRIAGTVISFSRTDEKHTREYI THLVQS 180
REPA_BLAST    KVELPFVEFAKLCGIPSSQSSRRLRERISPSLKRIAGTVISFSRTDEKHTREYI THLVQS 159
                *****

FIBTC360      AYYDTERDIVQLQAD----- 195
REPA_BLAST    AYYDTERDIVQLQADPRLFELYQFDRKVLQLKAINALKRRESAQUALYTFIESLPRDPAP 219
                *****

FIBTC360      -----
REPA_BLAST    ISLARLRARLNLKSPVFSQNQTVRRAMEQLREIGYLDYTEIQRGR TKFFCIHYRRPRLKA 279

FIBTC360      -----
REPA_BLAST    PNDESKENPLQPSPA EKVSPEMAEKLALLEKLGITLDDLEKLFKSR- 325

```

El alineamiento se realizó con la secuencia del gen *repA1* del plásmido pECO-824 de la cepa ECONIH1 de *Escherichia coli*.

GGATTAGATAAACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAG
 CGCACGAGGGAGCTACCAGGGGAAACGCCTGGGATCTTTATAGTCTGTCTGGGTTTCGCCAGGAAGC
 TCCCTCGGCATCTCCTTTTGGCCTTACCTTTCAGTCTTCCCTGTTGACGCGTTTCTAATTCC

- Búsqueda de secuencias similares en BLAST debido a que la base de datos plasmid pubMLST no tiene información para este grupo de incompatibilidad.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium plasmid pFPTB1 delta tnpA_ORF294_tetA_tetR_blaTEM_tnpR and tnp genes	228	228	61%	3e-56	100%	AJ634602.1
Klebsiella oxytoca strain M1 plasmid pKQXM1D, complete sequence	226	226	61%	1e-55	100%	CP008845.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport str. CVM 22462 plasmid pCFSAN000934_03, complete sequence	222	222	61%	1e-54	99%	CP009568.1
Klebsiella pneumoniae strain BB1088 plasmid pB1019, complete sequence	222	222	61%	1e-54	99%	JQ319775.1
Escherichia coli strain BB1093 plasmid pB1024, complete sequence	222	222	61%	1e-54	99%	JQ319768.1

- Para que fuera posible realizar el alineamiento se buscó en GenomeNet a que gen era similar el de nuestra cepa.

BLASTN Search Result

Database: genes-nt

DNA sequence database entries related to query - 41 hits

Show alignment

Entry	bits	E-val
Top 10 <input type="button" value="Clear"/> <input type="button" value="Select operation"/> <input type="button" value="Exec"/>		
<input checked="" type="checkbox"/> see:SNL254_B0004 pseudogene	219	2e-54
<input checked="" type="checkbox"/> e1r:ECO55CA74_26414 hypothetical protein	210	1e-51
<input checked="" type="checkbox"/> ecg:E2348_P2_09 probable plasmid replication initiation protein	210	1e-51
<input checked="" type="checkbox"/> sfe:SFxv_5143 hypothetical protein	206	1e-50
<input checked="" type="checkbox"/> kpm:KBHS_p500030 putative plasmid replication initiation pro...	192	3e-46
<input checked="" type="checkbox"/> eko:EK011_4775 hypothetical protein	188	3e-45
<input checked="" type="checkbox"/> sfe:SFxv_5142 hypothetical protein	183	1e-43
<input checked="" type="checkbox"/> sbci:SB85512_C0014 hypothetical protein	191	7e-28
<input checked="" type="checkbox"/> sm:SSON_P804 hypothetical protein	191	7e-28
<input checked="" type="checkbox"/> pbe:PB400037.00.0 hypothetical protein	191	7e-28
<input type="checkbox"/> pcb:PC403819.00.0 hypothetical protein	191	7e-28
<input type="checkbox"/> nve:NEMVE_v1g137021 hypothetical protein	129	3e-27
<input type="checkbox"/> ypx:YPD8_pPCF0003 hypothetical protein	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ypd:YPD4_pPCF0003 hypothetical protein	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ypx:YP23_pPCF0003 hypothetical protein	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ypg:YpAngola_0019 pseudogene	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ypg:YpAngola_0005 pseudogene	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ypm:Yp_pCF04 hypothetical protein	118	5e-24
<input type="checkbox"/> ecm:ECM535_B0006 hypothetical protein	118	5e-24
<input type="checkbox"/> sfe:SFxv_5160 hypothetical protein	111	7e-22

Kjcc Escherichia coli O127:H6 E2348/69 (EPEC): E2348_P2_09

Entry	E2348_P2_09	CDS	T00796
Definition	probable plasmid replication initiation protein		
Organism	ecg Escherichia coli O127:H6 E2348/69 (EPEC)		
Class	BRITE hierarchy		
SSDB	Ortholog Paralog Gene cluster GFIT		
Other DBs	NCBI-GI: 215274587 NCBI-GeneID: 7056260 UniProt: B7UTH0		
Position	pE2348-2:5224..5628 Genome map		
AA seq	134 aa <input type="button" value="AA seq"/> <input type="button" value="DB search"/>		
NT seq	405 nt <input type="button" value="NT seq"/> +upstream 0 nt +downstream 0 nt		

```

MLHYAGKQHRVRSICDIDGDFLFRSLTRVARSFQGERHRLTDGDNFLDTRKTLG
KEIRIRPRSRFSIGSAPLTSIARSDAQISGGETRDYKDRPRFPLVAFSCALLFIFSLP
VSFRCYGRGFSPHA
    
```

```

gtgcttcattgtggcagagaaaaaggcagcagcggcgctcagcagaatcgagataca
ggagatattccgcttcctcgtcactgactcgtcagctcgtcgttcggtcggggag
cgttacccgcttcagcaggggacggaattctcctggaagataccaggaagcacttagc
aaagaagataagcagcagggcagcggcttttccatagctccgccccccatgacagc
atcgcaaaattcagcgtcaaatcagtggtggcgaacccagcagcactataaagatccc
aggcgttccccctggtagctccctcgtggcgtctcctgctcgtcgttcgtttcagc
gtgctattccgctgtatggcggggttctcattccagcgtcga
    
```

-Una vez conocido lo anterior se realizó el alineamiento de la secuencia del IncoIE de la TCBUAP433-1 con la secuencia de GenomeNet.

```

>ecg:E2348_P2_09 probable plasmid replication initiation protein
Length=405

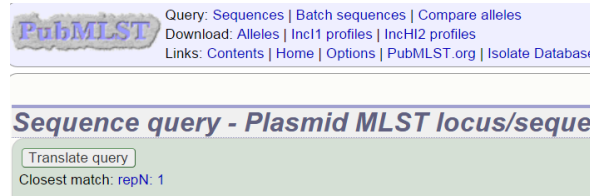
Score = 210 bits (232), Expect = 1e-51
Identities = 118/119 (99%), Gaps = 0/119 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 10 AAACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGC 69
|||
Sbjct 388 AACCGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGC 329

Query 70 ACGAGGGAGCTACCAGGGGAAACGCCTGGGATCTTTATAGTCTGTCTGGGTTTCGCCA 128
|||
Sbjct 328 ACGAGGGAGCTACCAGGGGAAACGCCTGGGATCTTTATAGTCTGTCTGGGTTTCGCCA 270
    
```

- IncN TC1-BUAP253

GTTCTCTGGTTATGTCTTATGCAGACGTATTTTCACAGCTTCAGTAAGCGAAGATGATGATGAGATGGCT
 GTACTCGGTGACTCTACTTTCAAAGTAAAGGTGGCTGACTATCAGCAAATTTTTTCAGGTAAGCCGTAAC
 CAGGCTATCAAGGATGTTAAAGAAGGCGTGTTGAGTTAAGCCGTTCTGCGGTAATCTTTTACCCGAAA
 GAAGGGAGTTTTGACTGCGTCGCGCGCCCTGGCTAACAGAGGCTGGCAGCCGATCAGCTCGTGGTATC
 TGGGAAATCGAATTTAACCATAAACTCCTGCGGTACATTTACGGCCTGACGAACCAGTTCACCACCTAC
 TCGCTCCGCGATTGTGGCAGTCTTCGAAATCCACGGACGATCCGCCTTTATGAAAGTCTTGCTCAATT
 AAATCTTCAGGCTTATGGG



- Para el alineamiento de estas secuencias se utilizó la secuencia tipo repN de la base de datos PubMLST.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

repN_pubMLST      TGCTTACTACCTCTCGCTAAAAGCAAAGCGGTTCTCTGGTTATGTCTTATGCAGACGTA 60
BUAP253IncN      -----GTTCTCTGGTTATGTCTTATGCAGACGTA 29
                    *****

repN_pubMLST      TTTCACAGCTTCAGTAAGCGAAGATGATGATGAGATGGCTGTACTCGGTGACTCTACTTT 120
BUAP253IncN      TTTCACAGCTTCAGTAAGCGAAGATGATGATGAGATGGCTGTACTCGGTGACTCTACTTT 89
                    *****

repN_pubMLST      CAAAGTAAAGGTGGCTGACTATCAGCAAATTTTTTCAGGTAAGCCGTAACCAGGCTATCAA 180
BUAP253IncN      CAAAGTAAAGGTGGCTGACTATCAGCAAATTTTTTCAGGTAAGCCGTAACCAGGCTATCAA 149
                    *****

repN_pubMLST      GGATGTTAAAGAAGGCGTGTTTGAGTTAAGCCGTTCTGCGGTAATCTTTTACCCGAAAGA 240
BUAP253IncN      GGATGTTAAAGAAGGCGTGTTTGAGTTAAGCCGTTCTGCGGTAATCTTTTACCCGAAAGA 209
                    *****

repN_pubMLST      AGGGAGTTTTGACTGCGTCGCGCGCCCTGGCTAACAGAGGCTGGCAGCCGATCAGCTCG 300
BUAP253IncN      AGGGAGTTTTGACTGCGTCGCGCGCCCTGGCTAACAGAGGCTGGCAGCCGATCAGCTCG 269
                    *****

repN_pubMLST      TGGTATCTGGGAAATCGAATTTAACCATAAACTCCTGCGGTACATTTACGGCCTGACGAA 360
BUAP253IncN      TGGTATCTGGGAAATCGAATTTAACCATAAACTCCTGCGGTACATTTACGGCCTGACGAA 329
                    *****

repN_pubMLST      CCAGTTCACCACCTACTCGCTCCGCGATTGTGGCAGTCTTCGAAATCCACGGACGATCCG 420
BUAP253IncN      CCAGTTCACCACCTACTCGCTCCGCGATTGTGGCAGTCTTCGAAATCCACGGACGATCCG 389
                    *****

repN_pubMLST      CCTTTATGAAAGTCTTGCTCAATTCAAATCTTCAGGCTTATGGG 464
BUAP253IncN      CCTTTATGAAAGTCTTGCTCAATTCAAATCTTCAGGCTTATGGG 433
                    *****
    
```

- Integrasas y genes de resistencia asociados con integrones.

• **Integrasa 1-TCBUAP360**

GCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCGGAAGACCT
 CGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTTTTC
 TGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTGCGCCAGCTTCTGTATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGG
 TTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTCGATCACGGCACGATCATCGTGCGGGAGGGCAAG
 GGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTACCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGT
 CGCGTGCACGGGCATGGTGGCTGAAGGACCAGGCCGAGGGCCGAGCGGCGTTGCGCTTCCCGA
 CGCCCTTGAGCGGAAGTATCCGCGCGCCGGGCATTCTGCGCGTGGTTCGGGTTTTTGCGCAG
 CACACGCATTGACCGATCCACGGAGCGGTGTCGTGCGTCGCCATCACATGTATGAC

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Escherichia coli strain YDC637 plasmid pYDC637, complete sequence	933	1861	100%	0.0	100%	KP056256.1
<input type="checkbox"/>	Pantoea sp. PSNIH1 plasmid pPSP-a3e, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009883.1
<input type="checkbox"/>	Pantoea sp. PSNIH1 plasmid pKPC-1c5, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009881.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH31 plasmid pKPN-c22, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009879.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH30 plasmid pKPN-b9c, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009874.1
<input type="checkbox"/>	Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pPSP-75c, complete sequence	933	1867	100%	0.0	100%	CP009869.1
<input type="checkbox"/>	Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pPSP-100, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009868.1
<input type="checkbox"/>	Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pKPC-56a, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009867.1
<input type="checkbox"/>	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH29 plasmid pKPC-e4e, complete sequence	933	933	100%	0.0	100%	CP009864.1

• **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

INT1_TCBUAP360      -----
INT_1               ATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTG 60

INT1_TCBUAP360      -----
INT_1               CGTGAGCGCATAACGCTACTTGCATTACAGCTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCCACTGG 120

INT1_TCBUAP360      -----
INT_1               GTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTCACCCGGCAACCTTGGGCAGCAGCGAA 180

INT1_TCBUAP360      -----
INT_1               GTCGAGGCATTTCTGTCTGCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGT 240

INT1_TCBUAP360      -----GCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGG 43
INT_1               CAGGCATTTGGCGGCTTGTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGG 300
                    *****

INT1_TCBUAP360      CTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGAT 103
INT_1               CTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGAT 360
                    *****

INT1_TCBUAP360      GAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTGCGCCAGCTTCTG 163
INT_1               GAAGTGGTTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTGCGCCAGCTTCTG 420
                    *****

INT1_TCBUAP360      TATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTC 223
INT_1               TATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTC 480
                    *****

INT1_TCBUAP360      GATCACGGCACGATCATCGTGCGGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTA 283
INT_1               GATCACGGCACGATCATCGTGCGGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTA 540
                    *****

INT1_TCBUAP360      CCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGTGCGGTGCACGGGCATGGTGGCTG 343
INT_1               CCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGTGCGGTGCACGGGCATGGTGGCTG 600
                    *****

INT1_TCBUAP360      AAGGACCAGGCCGAGGGCCGAGCGGCTTGGCGTTCCCGACGCCCTTGAGCGGAAGTAT 403
  
```

```

INT_1      AAGGACCAGGCCGAGGGCCGACGCGCGTTCGCGCTTCCCGACGCCCTTGAGCGGAAGTAT 660
*****

INT1_TCBUAP360 CCGCGCGCCGGGCATTCTGGCCGTGGTCTGGGTTTTTGGCGCAGCACACGCATTCGACC 463
INT_1      CCGCGCGCCGGGCATTCTGGCCGTGGTCTGGGTTTTTGGCGCAGCACACGCATTCGACC 720
*****

INT1_TCBUAP360 GATCCACGGAGCGGTGTCGTGCGTCGCCATCACATGTATGAC----- 505
INT_1      GATCCACGGAGCGGTGTCGTGCGTCGCCATCACATGTATGACCAGACCTTTCA 773
*****
    
```

• **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

INT1_TCBUAP360 -----
INT_1      MKTATAPLPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSLRTEQAYVHWVRAFIRFHGVRHPATLGSSE 60

INT1_TCBUAP360 -----LFFYGKVLCTDLPWLQEIGRPRPSRRLPVVLTDP 34
INT_1      VEAFLSWLANERKVSVSTHRQALALFFYGKVLCTDLPWLQEIGRPRPSRRLPVVLTDP 120
*****

INT1_TCBUAP360 EVVRILGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRISEGLQLRVKDLDFDHGTIIVREGKGSKDRALML 94
INT_1      EVVRILGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRISEGLQLRVKDLDFDHGTIIVREGKGSKDRALML 180
*****

INT1_TCBUAP360 PESLAPSLREQLSRARAWWLKDQAEGRSGVALPDALERKYPRAGHSWPWFVFAQHTHST 154
INT_1      PESLAPSLREQLSRARAWWLKDQAEGRSGVALPDALERKYPRAGHSWPWFVFAQHTHST 240
*****

INT1_TCBUAP360 DPRSGVRRHHMYD--- 168
INT_1      DPRSGVRRHHMYDQTF 257
*****
    
```

• **Integrasa 1-TCBUAP433**

CGCGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGGCTTCAGGAGATCG
 GAAGACCTCGGCCGTCGCGGCGCTTGCCGGTGGTGTGACCCCGGATGAAGTGGTTCGCATCCT
 CGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTTGTTCGCCAGCTTCTGTATGGAACGGGCATGCGGATC
 AGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTCGATCACGGCAGCATCATCGTGCGGG
 AGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTACCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGA
 GCAGCTGTCGCGTGCACGGGCATGGTGGCTGAAGGACCAGGCCGAGGGCCGCAGCGGCGTTGCG
 CTTCCCGACGCCCTTGAGCGGAAGTATCCGCGCGC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain YDC637 plasmid pYDC637, complete sequence	760	1514	100%	0.0	99%	KP056256.1
<input type="checkbox"/> Pantoea sp. PSNIH1 plasmid pPSP-a3e, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009883.1
<input type="checkbox"/> Pantoea sp. PSNIH1 plasmid pKPC-1c5, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009881.1
<input type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH31 plasmid pKPN-c22, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009879.1
<input type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH30 plasmid pKPN-b9c, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009874.1
<input type="checkbox"/> Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pPSP-75c, complete sequence	760	1520	100%	0.0	99%	CP009869.1
<input type="checkbox"/> Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pPSP-100, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009868.1
<input type="checkbox"/> Pantoea sp. PSNIH2 plasmid pKPC-56a, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009867.1
<input type="checkbox"/> Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae strain KPNH29 plasmid pKPC-e4e, complete sequence	760	760	100%	0.0	99%	CP009864.1

• **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

INT1_TCBUAP433 -----
INT 1 BLAST ATGAAAACCGCCACTGCGCCGTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTG 60

INT1_TCBUAP433 -----
INT 1 BLAST CGTGAGCGCATACGCTACTTGATTACAGCTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCCACTGG 120

INT1_TCBUAP433 -----
INT 1 BLAST GTTCGTGCCTTCATCCGTTTCCACGGTGTGCGTACCCGGCAACCTTTGGGAGCAGCGAA 180

INT1_TCBUAP433 -----
INT 1 BLAST GTCGAGGCATTTCTGTCTGGCTGGCGAACGAGCGCAAGGTTTCGGTCTCCACGCATCGT 240

INT1_TCBUAP433 -----GCGGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGG 51
INT 1 BLAST CAGGCATTGGCGCCTTGCTGTTCTTCTACGGCAAGGTGCTGTGCACGGATCTGCCCTGG 300
*****

INT1_TCBUAP433 CTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGCGCTTGCCTGGTGGTGTGACCCCGGAT 111
INT 1 BLAST CTTTCAGGAGATCGGAAGACCTCGGCCGTCGCGCGCTTGCCTGGTGGTGTGACCCCGGAT 360
*****

INT1_TCBUAP433 GAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCAGCTTCTG 171
INT 1 BLAST GAAGTGGTTCGCATCCTCGGTTTTCTGGAAGGCGAGCATCGTTTGTTCGCCAGCTTCTG 420
*****

INT1_TCBUAP433 TATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTC 231
INT 1 BLAST TATGGAACGGGCATGCGGATCAGTGAGGGTTTGCAACTGCGGGTCAAGGATCTGGATTTC 480
*****

INT1_TCBUAP433 GATCACGGCACGATCATCGTGCGGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTA 291
INT 1 BLAST GATCACGGCACGATCATCGTGCGGGAGGGCAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATGTTA 540
*****

INT1_TCBUAP433 CCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGTCGCGTGCACGGGCATGGTGGCTG 351
INT 1 BLAST CCCGAGAGCTTGGCACCCAGCCTGCGCGAGCAGCTGTCGCGTGCACGGGCATGGTGGCTG 600
*****

INT1_TCBUAP433 AAGGACCAGGCCGAGGGCCGACGCGCGTTCGCGCTTCCGACGCCCTTGAGCGGAAGTAT 411
INT 1 BLAST AAGGACCAGGCCGAGGGCCGACGCGCGTTCGCGCTTCCGACGCCCTTGAGCGGAAGTAT 660
*****

INT1_TCBUAP433 CCGCGCGC 419
INT 1 BLAST CCGCGCGC 668
*****

```

- **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

INT1_TCBUAP433 -----
INT 1 BLAST MKTATAPLPPLRSVKVLDQLRERIRYLHYSRLTEQAYVHWVRAFIRFHGVRHPATLGSSE 60

INT1_TCBUAP433 -----AALLFFYGKVLCTDLPWLQEIGRPRPSRRLPVVLTDP 37
INT 1 BLAST VEAFLSWLANERKVSVSTHRQALAAALLFFYGKVLCTDLPWLQEIGRPRPSRRLPVVLTDP 120
*****

INT1_TCBUAP433 EVVRILGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRISEGLQLRVKDLDFDHGTIIVREGKGSKDRALML 97
INT 1 BLAST EVVRILGFLEGEHRLFAQLLYGTGMRISEGLQLRVKDLDFDHGTIIVREGKGSKDRALML 180
*****

INT1_TCBUAP433 PESLAPSLREQLSRARAWWLKDAQEGRSGVALPDALERKYPR 139
INT 1 BLAST PESLAPSLREQLSRARAWWLKDAQEGRSGVALPDALERKYPR 222
*****

```

- **cmIA TCBUAP360**

TTTGGGCATGATCGCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCA
 ACGAGTTGCGGGCTTGAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCTGAACTTCTG
 GTTGTACACGTTGTGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTTCTCCATTGCG
 CCCGGACTAATGATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTCCGCC
 ACAGTGGCAATTGCCATGGTGTTTACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGG
 GGCAGCCCAAGTGTCTTGGCAATGGGAA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter baumannii plasmid pIQMTU433 DNA, complete genome, strain: IQMTU433	608	608	100%	1e-170	100%	AP014650.1
Salmonella enterica plasmid pCFSAN007428_01, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP009414.1
Salmonella enterica plasmid pCFSAN007405_01, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP009410.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. N418 plasmid pCFSAN000405_01, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP009409.1
Pseudomonas aeruginosa strain Pavimq1 urocanate hydratase gene, partial cds, and VIM gene cluster, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KJ463833.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae PittNDM01 plasmid3, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP006801.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNIH24 plasmid pKPN-e44, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP008800.1
Klebsiella oxytoca KONIH1 plasmid pKOX-96d, complete sequence	608	608	100%	1e-170	100%	CP008790.1
Comamonas liangduensis strain C-X2B class 1 integron dihydrofolate reductase (dfrA16), PSE-1/CARB-2 beta-lactamase (blaP1b), streptomycin/spectinomycin	608	608	100%	1e-170	100%	KJ575543.1
Staphylococcus aureus strain sm105 class 1 integron AadB (aadB), AadA1 (aadA1), and CmlA6 (cmlA6) genes, complete cds	608	608	100%	1e-170	100%	KJ002506.1
Escherichia coli strain F278 class 1 integron, partial sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KF921572.1
Escherichia coli strain A49 class 1 integron, partial sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KF921571.1
Escherichia coli strain A30 class 1 integron, partial sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KF921570.1
Escherichia coli strain E3 class 1 integron, partial sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KF921569.1
Escherichia coli strain F380 class 1 integron, partial sequence	608	608	100%	1e-170	100%	KF921568.1

• **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

blast_cmlA      GTGAGCTCAAAAAACTTTAGTTGGCGGTACTCCCTTGCCGCCACGGTGTGTGTTATCA 60
cmlA_360      -----

blast_cmlA      CCGTTCGATTTATTGGCATCACTCGGCATGGACATGTAAGTCCAGCAGTTCGGTTTATG 120
cmlA_360      -----

blast_cmlA      CCAAACGCGCTTGGTACGACAGCGAGCACAATTCAGCTTACGCTGACAACGTAAGTGGTC 180
cmlA_360      -----

blast_cmlA      ATGATTGGTGCCGGTACAGCTCTTGTGGACCGCTATCGGACCGACTGGGGCGCCGCCCC 240
cmlA_360      -----

blast_cmlA      GTTCTACTGGGAGGTGGCCTCGCTACGTTGTGGCGTCAATGGGCTCGCTCTTACGTC 300
cmlA_360      -----

blast_cmlA      TCGGCTGAAGTCTTTCTGGGGCTTCGGATTCTTCAGGCTTGTGGTGCCTCGGCGTGCCTT 360
cmlA_360      -----

blast_cmlA      GTTCCACATTTGCAACAGTACGTGACATTTACGCAGGTCGCGAGGAAAGTAATGTCATT 420
cmlA_360      -----

blast_cmlA      TACGGCATACTCGGATCCATGCTGGCCATGGTCCCAGGCGGTAGGCCATTGCTCGGAGCG 480
cmlA_360      -----

blast_cmlA      CTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGCTATCTTTGCGTTTCTAGGTTTGGGCATGATC 540
cmlA_360      -----TTTGGGCATGATC 13
                        *****

blast_cmlA      GCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGC 600
cmlA_360      GCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGC 73
                        *****

blast_cmlA      TTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTG 660
    
```

```

cmlA_360      TTGCAATGGTTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTG 133
*****

blast cmlA   TGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATG 720
cmlA_360     TGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATG 193
*****

blast cmlA   ATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTTCGCCACAGTGGCAATT 780
cmlA_360     ATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTTCGCCACAGTGGCAATT 253
*****

blast cmlA   GCCATGGTGTTTACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGT 840
cmlA_360     GCCATGGTGTTTACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGT 313
*****

blast_cmlA   GTCTTGCGAATGGGAATGGGATGCCTGATAGCTGGAGCAGTATTGCTTGCCATCACCAGAA 900
cmlA_360     GTCTTGCGAATGGGAA----- 329
*****

```

- **Alineamiento aminoacídico**

```

cmlA_TC360   -----
cmlA_blast   VSSKNFSWRYSLAATVLLSPFDLLASLGM MYLPAVFPMPNALGTTASTIQLTLTTYLV 60

cmlA_TC360   -----
cmlA_blast   MIGAGQLLFGPLSDRLGRRPVLLGGGLAYVVASMGLALTSSAEVFLGLRILQACGASACL 120

cmlA_TC360   -----
cmlA_blast   VSTFATVRDIYAGREESNVIYIGILGSLAMVPAVGPLL GALVDMWLGWRAIFAFGLGLMI 180
*****

cmlA_TC360   AASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLYTLCYAAGMGSFFVFFSIAPLM 64
cmlA_blast   AASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLYTLCYAAGMGSFFVFFSIAPLM 240
*****

cmlA_TC360   MGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKWGSPSVLRMG----- 109
cmlA_blast   MGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKWGSPSVLRMGCL IAGAVLLAITE 300
*****

cmlA_TC360   -----
cmlA_blast   IWALQSVLGF IAPMWLVGIGVATAVSVAPNGALRGFDHVAGTVTAVYFCLGGVLLGSI GT 360

cmlA_TC360   -----
cmlA_blast   LIISLLPRNTAWPVVYCLTLATVVVLGLSCVSRVKSGRQGEHVDVVALQSAESTSNPNR- 419

```

- ***cmlA* -TCBUAP433**

```

GCTCGGAGCGCTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGGCTATCTTTGCGTTTCTAGGTTT
GGGCATGATCGCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCAAC
GAGTTGCGGGCTTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCTGAACTTCTGGT
TGACACGTTGTGTTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTTTCTCCATTGCGCC
CGGACTAATGATGGGCAGGCAAGGTGTGTCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTCCGCCAC
AGTGGCAATTGCCATGGTGTTTACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGGGG
CAGCCCAAGTGTCTTGC GAATGGGATGGGATGCCTGATA

```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acinetobacter baumannii plasmid pIOMTU433 DNA, complete genome, strain: IOMTU 433	739	739	100%	0.0	100%	AF014650.1
Salmonella enterica plasmid pCFSAN007428_01, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP009414.1
Salmonella enterica plasmid pCFSAN007405_01, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP009410.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Heidelberg str. N418 plasmid pCFSAN00405_01, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP009409.1
Pseudomonas aeruginosa strain Pavimqi1 urocanate hydratase gene, partial cds, and VIM gene cluster, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	KJ463833.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae PittNDM01 plasmid3, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP006801.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNIH24 plasmid pKPN-e44, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP008800.1
Klebsiella oxytoca KONIH1 plasmid pKOX-86d, complete sequence	739	739	100%	0.0	100%	CP008790.1
Comamonas jianquduensis strain C-X2B class 1 integron dihydrofolate reductase (dfrA16), PSE-1/CARB-2 beta-lactamase (blaP1b), streptomycin/spectinomycin	739	739	100%	0.0	100%	KJ575543.1
Staphylococcus aureus strain sm105 class 1 integron AadB (aadB), AadA1 (aadA1), and CmlA6 (cmlA6) genes, complete cds	739	739	100%	0.0	100%	KJ002506.1
Escherichia coli strain F278 class 1 integron, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KF921572.1
Escherichia coli strain A49 class 1 integron, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KF921571.1
Escherichia coli strain A30 class 1 integron, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KF921570.1
Escherichia coli strain E3 class 1 integron, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KF921569.1

• **Alineamiento nucleotídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

blast cmlA          GTGAGCTCAAAAACTTTAGTTGGCGGTACTCCCTTGCCGCCACGGTGTGTGTTATCA 60
cmlA_BUAP433      -----

blast_cmlA         CCGTTCGATTTATTGGCATCACTCGGCATGGACATGTACTTGCCAGCAGTTCCGTTTATG 120
cmlA_BUAP433      -----

blast cmlA          CCAAACGCGCTTGGTACGACAGCGAGCACAATTCAGCTTACGCTGACAACGTACTTGGTC 180
cmlA_BUAP433      -----

blast cmlA          ATGATTGGTGCCGGTCAGCTCTTGTTTGGACCGCTATCGGACCGACTGGGGCGCCGCCCC 240
cmlA_BUAP433      -----

blast_cmlA         GTTCTACTGGGAGGTGGCCTCGCCTACGTTGTGGCGTCAATGGGCCTCGCTCTTACGTCA 300
cmlA_BUAP433      -----

blast_cmlA         TCGGCTGAAGTCTTTCTGGGGCTTCGGATCTTTCAGGCTTGTGGTGCCTCGGCGTGCCTT 360
cmlA_BUAP433      -----

blast cmlA          GTTCCACATTTGCAACAGTACGTGACATTTACGCAGGTCGCGAGGAAAGTAATGTCATT 420
cmlA_BUAP433      -----

blast_cmlA         TACGGCATACTCGGATCCATGCTGGCCATGGTCCCGGCGGTAGGCCCATTTGCTCGGAGCG 480
cmlA_BUAP433      -----GCTCGGAGCG 10
                        *****

blast_cmlA         CTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGGCTATCTTTGCGTTTCTAGGTTTGGGCATGATC 540
cmlA_BUAP433      CTCGTCGACATGTGGCTTGGGTGGCGGGCTATCTTTGCGTTTCTAGGTTTGGGCATGATC 70
                        *****

blast cmlA          GCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGC 600
cmlA_BUAP433      GCTGCATCTGCAGCAGCGTGGCGATTCTGGCCTGAAACCCGGGTGCAACGAGTTGCGGGC 130
                        *****

blast cmlA          TTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTG 660
cmlA_BUAP433      TTGCAATGGTCGCAGCTGCTACTCCCCGTTAAGTGCCCTGAACTTCTGGTTGTACACGTTG 190
                        *****

blast cmlA          TGTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATG 720
cmlA_BUAP433      TGTACGCCGCTGGAATGGGTAGCTTCTTCGTCTTTTCTCCATTGCGCCCGGACTAATG 250
                        *****
    
```

```

blast_cmlA      ATGGGCAGGCAAGGTGTGCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTCCGCCACAGTGGCAATT 780
cmlA_BUAP433   ATGGGCAGGCAAGGTGTGCTCAGCTTGGCTTCAGCCTGCTGTTCCGCCACAGTGGCAATT 310
*****

blast_cmlA      GCCATGGTGTTCACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGT 840
cmlA_BUAP433   GCCATGGTGTTCACGGCTCGTTTTATGGGGCGTGTGATACCCAAGTGGGGCAGCCCAAGT 370
*****

blast_cmlA      GTCTTGCGAATGGGAATGGGATGCCTGATAGCTGGAGCAGTATTGCTTGCCATCACCAGAA 900
cmlA_BUAP433   GTCTTGCGAATGGGAATGGGATGCCTGATA----- 400
*****
    
```

• **Alineamiento aminoacídico**

```

cmlATC433      -----
cmlA_blast     VSSKNFSWRYSLAATVLLLSPFDLLASLGMMDYLPVFFMPNALGTTASTIQLTLTTYLV 60

cmlATC433      -----
cmlA_blast     MIGAGQLLFGPLSDRLGRRPVLLGGGLAYVVASMGLALTSSAEVFLGLRILQACGASACL 120

cmlATC433      -----LGALVDMWLGWRAIFAFGLGLMI 23
cmlA_blast     VSTFATVRDIYAGREESNVIYGILGSLAMVPAVGPLLALVDMWLGWRAIFAFGLGLMI 180
*****

cmlATC433      AASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLYTLCYAAGMGSFVFFSIAPLGM 83
cmlA_blast     AASAAAWRFWPETRVQRVAGLQWSQLLLPVKCLNFWLYTLCYAAGMGSFVFFSIAPLGM 240
*****

cmlATC433      MGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKVGSPSVLRMGMGCLI----- 133
cmlA_blast     MGRQGVSQLGFSLLFATVAIAMVFTARFMGRVIPKVGSPSVLRMGMGCLIAGAVLLAITE 300
*****

cmlATC433      -----
cmlA_blast     IWALQSVLGFIAPMWLVGIGVATAVSAPNGALRGFDHVAGTVTAVYFCLGGVLLGSIGT 360

cmlATC433      -----
cmlA_blast     LIISLLPRNTAWPVVVYCLTLATVVVLGSLCVSRVKGSRGQGEHDLVVALQSAESTSNPNR- 419
    
```

• **suI3 TCBUAP360**

TTTTTCCGATGGAGGACTTATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGT
TGAAGATGGAGCAGATGTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTGATACAACCTGAA
GTGGGCGTTGTGGAAGAAATCAAAGACTCAAACCTGTCATTAAGGCTTTAAAAGAAAAAG
GCATTTCTATTTCTGTTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCCAGAGTTTTTGCATAGAACAAAAG
GTTGATTTTATTAATGATATTTCAAGGTTTTCTTATCCTGAGATTTATTCAGGCTTGCCAAAG
TCAGATTGCAAACCTTGTTGATGCACTCCGTTCCAGCGAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTG
AAACGAATCCGGAAGAGGTTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCT
TTAGTTGAGGCTGGTGTAAGCGTGAACGAATTATTCTTGATCGGGTATGGGCTTCTTTTAA
GGCTCTAATNGAACTTCTTTTCTTTGTTTTGAAGC

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli plasmid pH1038-142, complete sequence	926	926	100%	0.0	99%	KJ484634.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNH24 plasmid pKPC-484, complete sequence	926	926	100%	0.0	99%	CP008798.1
Escherichia coli strain S3 sulfonamide resistance protein (suI3) gene, partial cds	926	926	100%	0.0	99%	KF240814.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. U288 plasmid pSTU288-1, complete sequence	926	926	100%	0.0	99%	CP004058.1
Escherichia coli strain LTe3 class 2 integron, partial sequence	926	926	100%	0.0	99%	HQ386833.1
Escherichia coli plasmid pRYC306 suI3-integron type III c integron EstX (estX), Psp (psp), AadA2 (aadA2), CmlA1 (cmlA1), AadA1 (aadA1), OacI (oacI), and tr	926	926	100%	0.0	99%	NG_041272.1
Escherichia coli plasmid pRYC303 suI3-integron type III c integron EstX (estX), Psp (psp), AadA2 (aadA2), CmlA1 (cmlA1), AadA1 (aadA1), OacI (oacI), transp	926	926	100%	0.0	99%	NG_041271.1
Escherichia coli plasmid pRYC304 suI3-integron type III c integron EstX (estX), Psp (psp), AadA2 (aadA2), CmlA1 (cmlA1), AadA1 (aadA1), OacI (oacI), transp	926	926	100%	0.0	99%	NG_041270.1

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

BLAST SUL3          ATGAGCAAGATTTTTGGAATCGTAAATATAACCACCGATAGTTTTTCCGATGGAGGACTT 60
SUL3_TCBUAP360     -----TTTTTCCGATGGAGGACTT 19
                      *****

BLAST SUL3          TATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGTTGAAGATGGAGCAGAT 120
SUL3_TCBUAP360     TATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGTTGAAGATGGAGCAGAT 79
                      *****

BLAST SUL3          GTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTGATACAACCTGAAGTGGGCGTTGTGGAA 180
SUL3_TCBUAP360     GTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTGATACAACCTGAAGTGGGCGTTGTGGAA 139
                      *****

BLAST SUL3          GAAATCAAAGACTCAAACCTGTCATTAAGGCTTTAAAAGAAAAGGCATTTCTATTTCT 240
SUL3_TCBUAP360     GAAATCAAAGACTCAAACCTGTCATTAAGGCTTTAAAAGAAAAGGCATTTCTATTTCT 199
                      *****

BLAST SUL3          GTTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCCAGTATTTTGCATAGAACAAAAGGTTGATTTTATT 300
SUL3_TCBUAP360     GTTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCCAGTATTTTGCATAGAACAAAAGGTTGATTTTATT 259
                      *****

BLAST SUL3          AATGATATTC AAGTTTTTCTTATCCTGAGATTTATTTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGC 360
SUL3_TCBUAP360     AATGATATTC AAGTTTTTCTTATCCTGAGATTTATTTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGC 319
                      *****

BLAST SUL3          AAACCTTGTTGATGCACTCCGTTTCCAGCAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAAT 420
SUL3_TCBUAP360     AAACCTTGTTGATGCACTCCGTTTCCAGCAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAAT 379
                      *****

BLAST SUL3          CCGGAAGAGGTTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCTTTAGTT 480
SUL3_TCBUAP360     CCGGAAGAGGTTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCTTTAGTT 439
                      *****

BLAST SUL3          GAGGCTGGTGTAAAGCGTGAACGAATTTATCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTAGGC 540
SUL3_TCBUAP360     GAGGCTGGTGTAAAGCGTGAACGAATTTATCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTAGGC 499
                      *****

BLAST SUL3          TCTAATCCAGAAACATCTATTCTGTGTTTGAAGCGTTTCCCTGAAATTC AAGAAGCTTTT 600
SUL3_TCBUAP360     TCTAAT-----TCTAATTC AAGAAGCTTTT 505
                      *****
    
```

- **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

SUL3_TCBUAP360     -----FFRWRTYLDTDKAI EHALHLVEDGADVIDLGAASSNPDTTEVGVVEE 47
SUL3_BLAST        EQDFWNRKYNHR-FFRWRTYLDTDKAI EHALHLVEDGADVIDLGAASSNPDTTEVGVVEE 59
                      *****

SUL3_TCBUAP360     IKRLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFINDIQGFPYPEIYSGLAKSDCK 107
SUL3_BLAST        IKRLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFINDIQGFPYPEIYSGLAKSDCK 119
                      *****

SUL3_TCBUAP360     LVLMHVQRIGAAATKVTNPEEVFTSMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDRVWASF-AL 166
SUL3_BLAST        LVLMHVQRIGAAATKVTNPEEVFTSMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDRVWASF-AL 178
                      *****

SUL3_TCBUAP360     XELFFVFE----- 175
SUL3_BLAST        XELFFVFEAQKHLFLF-SVSLKFKKL 204
                      *****
    
```

• **sul3 TCBUAP433**

- TCCGATGGAGACTTTATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATT
TGGTTGAAGATGGAGCAGATGTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTG
ATACAACGAAGTGGGCGTTGTGGAAGAAATCAAAGACTCAAACCTGTCATTAA
GGCTTTAAAAGAAAAAGGCATTTCTATTTCTGTTGATACATTTAAACCTGAGGTTT
AGAGTTTTTGCATAGAACAAAAGGTTGATTTTATTAATGATATTCAGGTTTTCTT
ATCCTGAGATTTATTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGCAAACCTGTGTTGATGCA
CTCCGTTCCAGCAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAATCCGGAAGAGGT
TTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCTTTAGTTGAGGCTG
GTGTAAGCGTGAACGAATTATTCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTTAGGCTC
TAATCCAGAAACATCTATTCTGTTTTGAAGCGTTTCCCTGAAATTCAGAAGCTT
TTAATTTGCAAGTAATGATTGCAGTGTACGGAAATCATTCTTAGGTAAAATAACT

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Escherichia coli plasmid pH1038-142, complete sequence	741	741	95%	0.0	98%	KJ484634.1
Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae KPNH24 plasmid pKPC-484, complete sequence	741	741	95%	0.0	98%	CP008798.1
Escherichia coli strain S3 sulfonamide resistance protein (sul3) gene, partial cds	741	741	95%	0.0	98%	KF240814.1
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. U288 plasmid pSTU288-1, complete sequence	741	741	95%	0.0	98%	CP004058.1
Escherichia coli strain I_Te3 class 2 integron, partial sequence	741	741	95%	0.0	98%	HQ386833.1

GGAACCGATGTGAAATCTCGTTTAGCACCAACTCTTGCAGCAGAAATGTATGCAT
ACAAAAAAGGTGCAGATTATCTCCGCACCCATGATGTTAAGTCTTT **Alineamien**
to nucleotídico

SUL3TCBUAP433	-----TCCGATGGAGACTT	15
SUL3_BLAST	ATGAGCAAGATTTTGAATCGTAAATATAACCACCGATAGTTTTCCGATGGAGACTT	60

SUL3TCBUAP433	TATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGTTGAAGATGGAGCAGAT	75
SUL3_BLAST	TATTTAGATACAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGCATTTGGTTGAAGATGGAGCAGAT	120

SUL3TCBUAP433	GTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTGATACAACTGAAGTGGGCGTTGTGGAA	135
SUL3_BLAST	GTGATTGATTTGGGAGCCGCTTCCAGTAATCCTGATACAACTGAAGTGGGCGTTGTGGAA	180

SUL3TCBUAP433	GAAATCAAAGACTCAAACCTGTCAATTAAGGCTTTAAAAGAAAAAGGCATTTCTATTTCT	195
SUL3_BLAST	GAAATCAAAGACTCAAACCTGTCAATTAAGGCTTTAAAAGAAAAAGGCATTTCTATTTCT	240

SUL3TCBUAP433	GTTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCAGAGTTTTTGCATAGAACAAAAGTTGATTTTATT	255
SUL3_BLAST	GTTGATACATTTAAACCTGAGGTTTCAGAGTTTTTGCATAGAACAAAAGTTGATTTTATT	300

SUL3TCBUAP433	AATGATATTCAGGTTTTCTTATCCTGAGATTTATTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGC	315
SUL3_BLAST	AATGATATTCAGGTTTTCTTATCCTGAGATTTATTCAGGCTTGGCAAAGTCAGATTGC	360

SUL3TCBUAP433	AACTTGTGTTGATGCACCTCCGTTTCAGCGAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAAT	375
SUL3_BLAST	AACTTGTGTTGATGCACCTCCGTTTCAGCGAATTGGTGCAGCTACTAAAGTTGAAACGAAT	420

SUL3TCBUAP433	CCGGAAGAGGTTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCTTTAGTT	435
SUL3_BLAST	CCGGAAGAGGTTTTTACTTCCATGATGGAATTTTTTAAAGAAAGAATTGCTGCTTTAGTT	480

SUL3TCBUAP433	GAGGCTGGTGTAAAGCGTGAACGAATTATTCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTTAGGC	495
SUL3_BLAST	GAGGCTGGTGTAAAGCGTGAACGAATTATTCTTGATCCGGGTATGGGCTTCTTTTTAGGC	540

SUL3TCBUAP433	TCTAATCCAGAAACATCTATTCTGTTTTGAAGCGTTTCCCTGAAATTCAGAAGCTTTT	555
SUL3_BLAST	TCTAATCCAGAAACATCTATTCTGTTTTGAAGCGTTTCCCTGAAATTCAGAAGCTTTT	600

SUL3TCBUAP433	AATTTGCAAGTAATGATTGCAGTGTACGGAAATCATTCTTAGGTAAAATAACTGGAACC	615
SUL3_BLAST	AATTTGCAAGTAATGATTGCAGTGTACGGAAATCATTCTTAGGTAAAATAACTGGAACC	660

```

*****
SUL3TCBUAP433      GATGTGAAATCTCGTTTAGCACCAACTCTGCAGCAGAAATGTATGCATACAAAAAGGT 675
SUL3_BLAST         GATGTGAAATCTCGTTTAGCACCAACTCTGCAGCAGAAATGTATGCATACAAAAAGGT 720
*****

SUL3TCBUAP433      GCAGATTATCTCCGCACCCATGATGTTAAGTCTTT----- 710
SUL3_BLAST         GCAGATTATCTCCGCACCCATGATGTTAAGTCTTTATCAGATGCCTTGAAAATATCCAAA 780
*****

SUL3TCBUAP433      -----
SUL3_BLAST         GCCCTAGGTTAG 792

```

- **Alineamiento aminoacídico**

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

sul3_TCBUAP433      -----SDGGLYLDTDKAIEHALHLVEDGADVIDLGAASSNPDTTEVGVVE 45
blast_sul3         MSKIFGIVNITDSFSDGGLYLDTDKAIEHALHLVEDGADVIDLGAASSNPDTTEVGVVE 60
*****

sul3_TCBUAP433      EIKRLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFFINDIQGFPEIYSGLAKSDC 105
blast_sul3         EIKRLKPVIKALKEKGISISVDTFKPEVQSFCIEQKVDFFINDIQGFPEIYSGLAKSDC 120
*****

sul3_TCBUAP433      KLVLMHSVQRIGAAATKVTNPEEVFTSMMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDPMGFFLG 165
blast_sul3         KLVLMHSVQRIGAAATKVTNPEEVFTSMMEFFKERIAALVEAGVKRERIILDPMGFFLG 180
*****

sul3_TCBUAP433      SNPETSILVLKRFPEIQEAFNLQVMIAVSRKSFGLKITGTDVKSRLAPTLAAEMYAYKKG 225
blast_sul3         SNPETSILVLKRFPEIQEAFNLQVMIAVSRKSFGLKITGTDVKSRLAPTLAAEMYAYKKG 240
*****

sul3_TCBUAP433      ADYLRTHDVKS----- 236
blast_sul3         ADYLRTHDVKSLSDALKISKALG- 263
*****

```