



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS



CENTRO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS DE LOS ELEMENTOS GENÉTICOS QUE MOVILIZAN DETERMINANTES
DE VIRULENCIA Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE
Escherichia coli AISLADAS DE PRODUCTOS CRUDOS”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

PRESENTA:

M.C. MARIA GUADALUPE BALBUENA ALONSO

ASESORAS DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

PUEBLA, PUEBLA

DICIEMBRE 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 16 de diciembre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

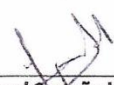
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del comité revisor de tesis de doctorado de la alumna **María Guadalupe Balbuena Alonso**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis de los elementos genéticos que movilizan determinantes de virulencia y resistencia a antimicrobianos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos crudos”

A nuestro juicio, la alumna **María Guadalupe Balbuena Alonso** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.


Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”




D.C. Miguel Castañeda Lucio




D.C. Candelario Vázquez Cruz



D.C. Margarita Ma. de la Paz Arenas Hernández



D.C. Manel Camps



D.C. Gerardo Cortés Cortés

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ∞ Gracias a la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por ser mi alma mater en la licenciatura y por recibirme con las puertas abiertas ahora en mi doctorado.
- ∞ Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt)** por la beca nacional de doctorado otorgada (589143) durante el periodo 2020-2024.
- ∞ A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado BUAP** por el apoyo brindado para los gastos de transportación para realizar las estancias en la Universidad de Sonora y la Universidad de California; así como para la participación a distintos congresos nacionales e internacionales.
- ∞ A la **Dirección del Instituto de Ciencias BUAP** por brindarme apoyo económico para participar y asistir a distintos congresos nacionales.
- ∞ A la coordinación del **Centro de Investigaciones Microbiológicas** por brindarme el apoyo y la orientación para gestionar recursos a otras dependencias BUAP y asistir y participar en congresos nacionales e internacionales. Gracias en especial a Angeles por siempre tener la disponibilidad de solucionar dudas, así como de siempre dar una sonrisa, aunque le haya preguntado 20 veces por el mismo requisito. Gracias a la Contadora y la Dra Rayito por siempre estar al pendiente del bienestar en el edificio y a todo el personal de limpieza y mantenimiento porque siempre tuvieron a bien apoyarme en todo lo que refería al correcto funcionamiento del laboratorio.
- ∞ A la **Universidad de Sonora** por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en sus instalaciones en el Laboratorio y Biología Molecular y Genómica y en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, que me permitió desarrollar parte de mi tesis.
- ∞ A **University of California**, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en el Departamento de Microbiología y Toxicología ambiental y por brindarme el apoyo económico para gastos viáticos y alojamiento durante la misma.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **Dra Rosa del Carmen Rocha Gracia**, quiero agradecerle infinitamente por creer en mi en todo momento, por darme un lugar en el laboratorio y en su vida. Por darme la confianza que necesitaba a cada paso, por hacerme participe de tantos y tantos proyectos y por hacerme parte de su vida, por compartir no sólo en el laboratorio sino de manera personal. Muchas gracias por todo, por aceptarme sin conocerme de nada. La admiro y la quiero sinceramente.

A la **Dra Patricia Lozano Zarain**, gracias por animarme en retos que me parecía difíciles y algunos imposibles siempre con un “a tuestas y a señas”, gracias por hacerme participe del laboratorio y de su vida. Por todos los buenos momentos que pasamos. La admiro profundamente y valoro cada una de sus enseñanzas.

Al **Dr Gerardo Cortés Cortés** por apoyarme siempre, por siempre tener disponibilidad para hablar de dudas académicas y no tan académicas. Gracias por siempre ser ese humano excepcional, un académico paciente y un investigador sin igual. Me siento muy afortunada de poder llamarte amigo, un gran amigo. Gracias por caminar a mi lado estos cuatro años, espero algún día ser la mitad de buena que eres.

Al **Dr Manel Camps**, muchas gracias por ayudarme a visualizar cada conjunto de información como algo publicable, por ser un ejemplo de organización, productividad y paciencia; gracias por la disponibilidad para trabajar en cada uno de los artículos. Gracias también por animarme a realizar una estancia en la Universidad de California y por gestionar todo el proceso; en definitiva, fue una gran experiencia

A la **Dra Margarita Maria de la Paz Arenas Hernández**, una investigadora a la cual admiro mucho. Le agradezco por la disponibilidad de resolver preguntas, por permitirnos los equipos de su laboratorio, por los comentarios tan acertados en cada tutorial y por las preguntas que han enriquecido no sólo esta tesis y los tutorales; sino también para visualizar mi futuro como académica.

Al **Dr Miguel Castañeda Lucio**, muchas gracias por esa primera clase de Hospedero Parásito, escucharlo hablar del tema molecular con tanta pasión en definitiva es inspirador. Muchas gracias por cada aportación al proyecto y por la disponibilidad de resolver preguntas, por apoyar siempre con comentarios, consejos y sugerencias en cada paso de este proyecto de investigación.

Al **Dr Candelario Vázquez Cruz** muchas gracias por brindarme sus sugerencias y observaciones en cada tutorial; así mismo, por su paciencia y disponibilidad para aclarar dudas y también para poder llevar a cabo de manera rápida todo el proceso a lo largo de estos cuatro años.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A quien dirige este basto mundo de maravillas y perfección, gracias por permitirme llegar hasta donde estoy.

Gracias a **mi familia**, porque sin cada uno de ustedes no hubiera sido posible este momento. Gracias porque a pesar de que pasamos momentos difíciles a lo largo de estos años (incluida una pandemia) seguimos siendo unidos y eso nos volvió más fuertes. Los amo.

Gracias a **mis amigos, mis fulanitas** (Isa, Ile, Fer, Italia, Martita y Dania) por el apoyo siempre, por hacer cada uno de mis logros los suyos y celebrar. **A mis inmortales** (Telésforo, Andry y Erika) gracias por saber que siempre estaremos ahí para los demás aún a través de los años. **A los prepos** (Tony, Julissa, Alma, Hector y Paty) por siempre ser felices por las cosas que me ponen feliz, gracias por ser un apoyo ilimitado. **A Ricardo**, por siempre estar dispuesto a platicar, por leerme y escuchar sin juzgar. **A José Carlos** por su apoyo incondicional, por su paciencia y amor.

Gracias al **Dr Ángel Granados Arvizu**, quien sin su ayuda y apoyo no hubiera sido posible llegar al día de hoy. Gracias por hacerme sentir orgullosa de cada pasito en el recorrido del doctorado.

Gracias al **Dr Edwin Barrios Villa** de quien siempre tuve un consejo, una palabra de aliento y un apoyo incondicional; eres inspirador, un gran académico y amigo. Gracias a la **Dra Jessica Gómez Martínez**, mi primer *labpartner*, por todas las risas, por todo el apoyo y por su gran amistad. Gracias a la **Dra Elena López Bello**, por ser una gran ser humano, a quien considero amiga y un ejemplo a seguir en este camino de la investigación.

Gracias a mis **compañeros y amigos de LMHyC**: Ale, Lore (quien vino con premio doble porque trajo a mi vida a José Carlos), Luis, Chuy, Cristian, Monse, Jimmy, Yesenia, Maria, Brenda, Sebastián, Caro, Hania, Suemy, Carlos, la Dra Cristy, Isamar, la Dra Ana, Erick, Grecia, Jay y Aline. Gracias por todos los buenos momentos que pasamos celebrando cumpleaños y haciendo plática todos los días, después de las 4:00pm se ponían profundas. Gracias por todo el apoyo, el respaldo y el trabajo en equipo; gracias por cada momento vivido desde las 8 de la mañana hasta inclusive la 1 de mañana del siguiente día.

Gracias a los **chicos de la Universidad de Sonora**, Vivi, Judith, Caro, Haro, Alejandro y Melani, por todas sus atenciones y buena vibra durante mi estancia en Caborca. Gracias a Caison, Tony, Neo, Cristina y Amanda por recibirme tan bien en la **Universidad de California**. Gracias a los excelentes compañeros del curso de **Paraguay, el Wellcome Genome** nos unió, pero el corazón nos hizo amigos, Christopher, Majo, Carmen y Emily.

"Nada en este mundo debe ser temido, solo entendido. Ahora es el momento de entender más, para poder temer menos."

Marie Curie

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	16
1. 1 Alimentos frescos como reservorios de microorganismos.	16
1.2 Los dos rostros de <i>Escherichia coli</i>	17
1.3 Resistencia a los antibióticos.....	19
1.3.1 Antibióticos β -lactámicos.....	20
1.3.1 β -lactamasas.	22
1.3.2 Resistencia a fosfomicina.	23
1.4 Plásmidos.	25
1.4.1 Módulo de replicación.....	26
1.4.2 Módulo de propagación.	28
1.4.3 Módulo de mantenimiento o permanencia.	29
1.4.4 Módulo de adquisición o adaptabilidad.....	31
1.4.5 Sistemas de clasificación de plásmidos.....	31
1.5 Otros elementos genéticos móviles 34	
1.5.1 Secuencias de inserción y transposones.	34
1.5.2 Integrones 35	
1.6 Formación de biopelícula..... 36	
1.6.1 Formación de biopelícula en <i>E. coli</i> 37	
2. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	40
3. ANTECEDENTES NACIONALES	44
4. JUSTIFICACIÓN	46
5. OBJETIVOS	48
5.1 OBJETIVO GENERAL	48
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	48
6. MATERIALES Y MÉTODOS	50
Esquema general de trabajo.....	50
6.1 Selección de genomas de <i>E. coli</i> de bases de datos públicas.	51
6.2 Cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales recolectados en la ciudad de Puebla.....	52

6.3 Extracción de ADN y secuenciación masiva de las 12 cepas de <i>E. coli</i>	53
6.4 Análisis bioinformático de genomas de <i>E. coli</i> de la base de datos y las 12 cepas secuenciadas.....	53
6.4.1 Análisis bioinformático de plásmidos de genomas <i>E. coli</i> de la base de datos y 12 cepas secuenciadas aisladas de productos frescos.	53
6.4.2 Análisis bioinformático de genes de virulencia y resistencia a antibióticos de los genomas de las bases de datos y las 12 cepas secuenciadas.	54
6.4.3 Análisis bioinformático de elementos genéticos móviles de genomas <i>E. coli</i> de la base de datos y 12 cepas secuenciadas aisladas de productos frescos.	56
6.4.4 Relación filogenética.....	56
6.4.4.1 Relación filogenética del análisis de los genomas de <i>E. coli</i> recolectados de las bases de datos públicas.	56
6.4.4.2 Relación filogenética de la cepa A23EC	56
6.5 Análisis del tamaño y número de plásmidos de las 12 cepas aisladas de vegetales.	57
6.5.1 Preparación de insertos	57
6.5.2 Lisis bacteriana	58
6.5.3. Lavado de insertos.....	58
6.5.4 Digestión enzimática con nucleasa S1.....	58
6.5.5 Preparación del gel de agarosa.	59
6.5.6 Electroforesis.	59
6.5.7 Visualización.	59
6.6 Evaluación fenotípica de la resistencia a fosfomicina.....	60
6.6.1 Técnica de difusión en disco.....	60
6.6.2 Técnica de dilución en agar.....	60
6.7 Evaluación de la producción de betalactamasas tipo AmpC mediante la prueba tridimensional.	60
6.8 Ensayos de conjugación.....	61
6.9 Ensayos de formación de biopelícula.	62
6.9.1 Formación de biopelícula en placa de 96 pozos.	62
6.9.2 Formación de biopelícula en superficie de espinaca.....	63
6.10 Ensayos de adherencia bacteriana a células HeLa.	64

6.11 Ensayos de invasión bacteriana a células HeLa.....	65
7. RESULTADOS	66
PRIMERA ETAPA.....	66
7.1 Análisis bioinformático de genomas de <i>E. coli</i> depositados en las Bases de datos públicos.	66
7.1.1 Filogénica de genomas de <i>E. coli</i>	66
7.1.2. Caracterización de plásmidos de genomas de <i>E. coli</i> alimentarios y clínicos.	69
7.1.3 Contenido de genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) en plásmidos.	74
7.1.4 Contenido de genes de virulencia en plásmidos	80
7.1.5 Vinculación de ARG con plásmidos (Inc/Unidades Taxonómicas Plasmidicas, PTU).....	82
7.1.8 Discusión.....	87
SEGUNDA ETAPA	92
7.2 Análisis de 12 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales	92
7.2.1 Confirmación del número y tamaño de plásmidos por PFGE+S1	92
7.2.2 Caracterización genómica de cepas de <i>E. coli</i> secuenciadas por Illumina. ..	92
7.2.3 Identificación de genes de virulencia, resistencia a antibióticos y replicones.	93
7.3 Análisis individual de la cepa A23EC aislada de espinaca	96
7.3.1 Análisis filogenético de A23EC.....	96
7.3.2 Viruloma de A23EC, ubicación y entorno genómico.	98
7.3.3 Perfil fenotípico y genotípico de resistencia a los antibióticos.....	99
7.3.3 Identificación y caracterización del plásmido (pA23EC).....	102
7.3.4 Discusión.....	105
7.4 Análisis de las secuencias que identificaron <i>bla</i> _{CMY-2} plasmídica.	110
7.4.1 Análisis de genomas de <i>E. coli</i> productora de CMY-2.....	110
7.4.2 Análisis del viruloma, resistoma y plasmidoma de cepas A65EC y A134_1EC.	110
7.4.3 Discusión.....	116
7.5 Análisis fenotípico y genotípico de cepas resistentes a fosfomicina.	119
7.5.1 Resistencia fenotípica a fosfomicina y genes asociados.	119

7.5.2 Discusión.....	122
7.6 Análisis de formación de biopelícula, adherencia e invasión.	126
7.6.1 Formación de biopelícula.	126
7.7 Adherencia e invasión de <i>E. coli</i> en células HeLa.	130
8. CONCLUSIONES	137
9. PERSPECTIVAS	140
10. REFERENCIAS	142
11. ANEXOS	180
12. ACTIVIDADES DESARROLLADAS DURANTE EN DOCTORADO	193
12.1 Publicaciones derivadas de esta tesis	193
12.2 Colaboración en publicaciones.	193
12.3 Registros en el NCBI	193
12.4 Premios	194
12.5 Presentaciones en congresos como autor principal	195
12.6 Presentaciones en Congresos como coautor	197
12.7 Cursos y talleres	199
12.8 Actividades de difusión y divulgación.....	200
12.9 Publicaciones.....	201

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquemas principales mecanismos de resistencia a los antibióticos en <i>E. coli</i>	15
Figura 1.2 Estructuras generales de los andamiajes de los 5 tipos de β -lactámicos.....	16
Figura 1.3 Relaciones moleculares y funcionales entre las β -lactamasas que confieren resistencia a β -lactámicos.....	18
Figura 1.4 Diagrama del transporte en la célula bacteriana a través del GlpT y UhpT.....	19
Figura 1.5 Representación esquemática de la organización de los plásmidos en módulos.....	21
Figura 1.6 Vista esquemática de la constitución genética de los plásmidos transmisibles.....	24
Figura 1.7 Mecanismo de mantenimiento de plásmidos de sistemas Toxina-Antitoxina.....	25
Figura 1.8 Clasificación y mecanismos de transposición de transposones.....	29
Figura 1.9 Estructura general de los elementos de los integrones clase I y clase II.....	31
Figura 1.10 Etapas de la adhesión de la biopelícula microbiana.....	33
Figura 7.1 Fuentes de las secuencias genómicas de <i>E. coli</i> utilizadas en el presente estudio.....	59
Figura 7.2 Clasificación de filogrupos, serotipos y patotipos.....	60
Figura 7.3 Distribución del número de copias de plásmidos.....	61
Figura 7.4 Distribución del tamaño del plásmido y perfil de movilización.....	62
Figura 7.5 Representación de grupos de incompatibilidad en función de la fuente plasmídica.....	63
Figura 7.6 Clasificación PTU de plásmidos alimentarios. A. Clasificación de PTU y su correspondencia con las familias de relaxasas (MOB).....	65
Figura 7.7 Distribución de genes ARG en plásmidos, desglosada por clase de antibiótico, considerando el grupo de incompatibilidad (Inc).....	67
Figura 7.8 Contexto genético del gen <i>bla</i> _{NDM-5}	68
Figura 7.9 Contexto genético del gen <i>mcr</i> , comparando plásmidos alimentarios y clínicos.....	69
Figura 7.10 Asociación entre el contenido de genes de virulencia y el tipo de incompatibilidad (Inc).....	71
Figura 7.11 Superposición de factores de resistencia y virulencia, desglosados por combinaciones específicas de grupos PTU-Inc.....	74
Figura 7.12 Filogenia de la cepa A23EC en el contexto de genomas ST131 de la base de datos <i>GenBank</i>	86

Figura 7.13 Comparación de la estructura genética de las tres islas de patogenicidad encontradas en A23EC.....	88
Figura 7.14 Estructura genómica y contexto genético de la secuencia TnMB1860 en la cepa A23EC.....	89
Figura 7.15 Disposición genética comparativa de TnMB1860 en genomas pertenecientes al sublinaje C2b.....	90
Figura 7.16 Alineación de los genomas contenidos en los grupos 3=A, 2=B, 4=C y 5=D. Panel A. Disposición genética comparativa de las secuencias en el grupo 3.....	91
Figura 7.17 Análisis comparativo del plásmido pA23EC con los otros 11 plásmidos del subtipo FII_31/36:FIA_4/20:B1 identificados dentro del sublinaje C2b del subclado C2.....	92
Figura 7.18 Estructura de los plásmidos de cepas productoras de <i>bla</i> _{CMY-2} . Cepa A65EC. y cepa A134_1EC.....	100
Figura 7.19 Alineamiento de A65EC_p3 y A134EC_p2 con los plásmidos reportados con mayor identidad y cobertura.....	101
Figura 7.20 Estructura y comparación de plásmidos que albergan el gen <i>fosA</i> y entornos genéticos del gen <i>fosA</i>	107
Figura 7.21 Comparación de la producción de biopelícula a 20°C por 20 y 24 horas.....	112
Figura 7.22 Comparación de la producción de biopelícula a 20°C/37° por 24 horas.....	113
Figura 7.23 Comparación de la producción de biopelícula en superficie de poliestireno y superficie de la hoja de espinaca a 37°C por 24 horas.....	115
Figura 7.24 Genes de <i>E. coli</i> involucrados en la formación de una biopelícula....	116
Figura 7.25 Patrones de adherencia de <i>E. coli</i> a células HeLa.....	119
Figura 7.26. Capacidad de adherencia e invasión en células HeLa de las cepas de <i>E. coli</i> , aisladas de alimentos.....	120

INDICE DE TABLAS

Tabla 6.1 Características de 12 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales.....	43
Tabla 6.2. Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-S1.....	49
Tabla 6.3. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la búsqueda de genes de resistencia.....	51
Tabla 7.1 Representación de ARG, agrupados por familias y superposición entre conjuntos de datos de plásmidos alimentarios y clínicos.....	63
Tabla 7.2 Representación del Índice de Jaccard (IJ) para cada categoría (resistencia y virulencia) en plásmidos representados por al menos tres unidades en genomas alimentarios y clínicos.....	68
Tabla 7.3. Contenido génico de las combinaciones PTU-Inc con alto Índice de Jaccard.....	73
Tabla 7.4 Caracterización parcial del contenido de plásmidos de cepas de <i>E. coli</i>	78
Tabla 7.5 Caracterización de los 12 genomas de <i>E. coli</i> aisladas de vegetales...	79
Tabla 7.6 Genes de virulencia y resistencia a antibióticos identificados en <i>E. coli</i> aisladas de alimentos frescos.....	80
Tabla 7.7 Características genómicas, viruloma, resistoma y plasmidoma de las cepas A65EC y A134_1EC.....	95
Tabla 7.8 Caracterización de los plásmidos contenidos en la cepa A65EC.....	96
Tabla 7.9 Caracterización de los plásmidos contenidos en la cepa A134_1EC....	96
Tabla 7.10 Caracterización de la resistencia fenotípica a fosfomicina y los genes asociados.....	102

RESUMEN

La migración a una dieta más saludable ha incrementado el consumo de productos frescos; sin embargo, en muchas ocasiones, no tienen un proceso de lavado y desinfección adecuado pudiendo albergar bacterias portadoras de genes de virulencia y resistencia a antibióticos. *Escherichia coli* es una de las bacterias mayormente asociadas a brotes de origen alimentario; además de ser un organismo de importancia clínica debido a sus altas tasas de multidrogoresistencia (MDR), donde su diseminación está atribuida principalmente a su plasticidad genética a través de elementos móviles como los plásmidos. Este estudio se centra en primera instancia en un análisis bioinformático de más de 1700 genomas de *E. coli* disponibles en las bases de datos, de los cuales 649 genomas fueron de origen clínico y 77 de origen alimentario; en los cuales se identificaron 1624 y 161 plásmidos provenientes de muestras clínicas y alimentarias, respectivamente. Mostrando una clara divergencia entre las cepas provenientes de alimentos y clínicos; no así en el caso de los plásmidos de ambos grupos, los que mostraron un tamaño promedio de 90-120 Kb, compartían características como el tipo de relaxasa, replicón y PTU. Además, el análisis del contenido de genes de virulencia y resistencia permitió corroborar una frecuencia de genes compartido mayor a los esperado si esto ocurriera al azar. Además, el índice de Jaccard permitió identificar plásmidos especializados en el movimiento de genes de resistencia y virulencia, en algunos casos, mostrando una preferencia por uno u otro grupo. Posteriormente, a partir de la recolección de 140 muestras de vegetales, se aislaron doce cepas de *E. coli* provenientes de distintos vegetales. Mediante PFGE se determinó que todas mostraron la presencia de al menos un plásmido, lo que se confirmó utilizando la secuenciación del genoma completo. Particularmente, la cepa A23EC fue caracterizada como miembro del linaje pandémico ST131 subclado C2b caracterizado por la presencia de un transposón compuesto TnMB1860 que portaba los genes de resistencia *aac(3)-Ile*, *tmrB*, *aac(6')-Ib-cr*, *blaOXA-1*, *ΔcatB3*, *blaCXT-M-15*. Además, mostró la presencia de tres islas de patogenicidad que la pudieron caracterizar como ExPEC y potencialmente UPEC. Adicionalmente, se demostró la capacidad de conjugación del plásmido pA23EC portador del gen *tetA* y los genes *nemRA* relacionados a la resistencia al efecto del cloro. Por otra parte, se analizaron la cepa A65EC y A134_1EC que portaron el gen *bla_{CMY-2}* mostrando su sintenia en ambos casos como *ISEcp1-tnpA-bla_{CMY-2}-blc-sugE* y se confirmó la producción de betalactamasas tipo AmpC mediante pruebas fenotípicas. Así mismo, la cepa A134_1EC junto con las cepas A38EC, A101EC y A6EC mostraron la presencia plasmídica del gen *fosA* vinculado a la resistencia a fosfomicina. Finalmente, las cepas se sometieron al análisis de la producción de biopelícula, mostrando una variabilidad entre las cepas; sin embargo, las cepas positivas no solo presentaron esta capacidad a 37°C, sino también a 20°C una temperatura de almacenamiento convencional en comercios al por menor. En conclusión, este estudio muestra la presencia de *E. coli* potencialmente patógenas con una carga importante de genes de virulencia y resistencia

a antibióticos y la capacidad potencial de transferirla, en productos frescos; lo que representa un riesgo importante para la salud humana, lo que resalta la necesidad de un sistema de vigilancia más completo para las cepas extraintestinales de entornos no clínicos.

ABREVIATURAS

%GC	Porcentaje de guanina-citosina
ARG	Genes de resistencia a antimicrobianos
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio Eagle modificado por Dulbecco)
DO	Densidad óptica
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
EGM	Elemento genético móvil
g	gramos
Kb	Kilobases
MDR	Multidrogo resistente
mg	miligramos
µg	microgramos
NMP	Número más probable
ORF	Open reading frame
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de sales de fosfato
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PTU	Unidades Taxonómicas Plasmídicas
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Secuenciotipo
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UFC	Unidad formadora de colonias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> utopatógena
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 Alimentos frescos como reservorios de microorganismos.

El consumo de alimentos frescos se ha incrementado en los últimos 20 años ya que los consumidores han migrado a un estilo de vida saludable y equilibrada. Además, su consumo se encuentra asociado con la prevención contra enfermedades no transmisibles como diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, obesidad y varios tipos de cáncer; de hecho, la FAO recomienda una ingesta diaria de 400 g de frutas y verduras (FAO, 2021). En este sentido México reporta un consumo *per cápita* diario de 200-350 g de frutas y verduras, así mismo, se encuentra en el octavo lugar de países con mayor producción de hortalizas y el sexto en producción de frutas (FAO, 2021).

Principalmente este tipo de productos se consumen crudos o mínimamente procesados, considerando únicamente actividades como la cosecha, el transporte, lavado, pelado, corte, desinfección y enjuague (Mendoza et al., 2022) lo que los vuelve vulnerables a contaminación por microorganismos patógenos provenientes del estiércol, suelo, aguas residuales y fauna silvestre durante el crecimiento en los campos. Aunque, la contaminación también puede ocurrir durante la comercialización, el almacenamiento o en la manipulación y preparación de alimentos (Balali et al., 2020; Hussain, 2016), lo que algunas veces hace que frecuentemente los productos frescos se vinculen con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) ocasionando brotes alimentarios, definidos como la aparición de casos de una enfermedad relacionados con el consumo de un mismo alimentos contaminado.

Esto ha llevado a la aparición de brotes relacionados a productos frescos mayoritariamente documentados en América del Norte y Europa; tan sólo en el 2019, se reportó que las verduras fueron los productos agrícolas frescos con mayor implicación en brotes de enfermedades infecciosas con el 34.1% en Europa y del 47.4% en América del Norte (Aiyedun et al., 2020); en los cuales los agentes etiológicos más comunes fueron norovirus con 120 millones de casos (Callejón et al., 2015) siendo las bacterias *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, las responsables del

82% de las hospitalizaciones asociadas a ETAS (Balali et al., 2020; CDC, 2018). En EE. UU. entre 2006 y 2023, *S. enterica* provocó 7,256 casos principalmente debido al consumo de pepinos, ensaladas y germinados; *E. coli* se posicionó en el segundo lugar con 998 casos debido al consumo de lechuga, espinaca y ensaladas y *L. monocytogenes* con 330 casos asociados al consumo de melón y ensaladas ocupó el tercer lugar (CDC, 2023; Thomas et al., 2024); sin embargo, a diferencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, *E. coli* no es considerada un patógeno en primera instancia; lo que en ocasiones conlleva una subestimación del riesgo que representa su presencia en alimentos.

1.2 La dualidad de *Escherichia coli*, importancia de las cepas patógenas en la salud humana.

E. coli es uno de los microorganismos modelo más estudiados en la investigación de microbiología y biología molecular (Blount, 2015). Esta bacteria está definida como Gramnegativa con forma bacilar y también es conocida por ser miembro de la microbiota de los mamíferos contribuyendo a la digestión, a la protección de la mucosa y a la producción de vitamina K, la cual es importante para la coagulación sanguínea (Yan et al., 2022); sin embargo, a través de la adquisición de genes de virulencia, un grupo de cepas evolucionó para causar enfermedades diarreicas, del tracto urinario, del torrente sanguíneo e inclusive causar sepsis o meningitis (Pakbin et al., 2021). Las *E. coli* patógenas se dividen ampliamente en dos grupos, *E. coli* patógena intestinal (InPEC) y *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). En el primer grupo se encuentran siete patotipos: enteropatogénica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), productora de toxina Shiga (STEC/EHEC), de adherencia difusa (DAEC) y entero-invasiva (AIEC). Por otra parte, en el segundo grupo destacan la uropatogénica (UPEC) causante de enfermedades infecciosas del tracto urinario, *E. coli* relacionada a sepsis (SEPEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* causante de meningitis (MNEC) (Pokharel et al., 2023).

Algunos de estos patotipos constituyen preocupaciones de salud pública como patógenos transmitidos por alimentos, ya que han causado varios brotes fatales en todo el mundo. Aunque de manera interesante la incidencia de ETAS causadas por

microorganismos en productos frescos, particularmente ocasionadas por *E. coli* es superior en EE. UU. con el 12.2%, en contraste con Europa el cual solo es del del 3.8% (Callejón et al., 2015); en 2011 se reportó uno de los mayores brotes alimentarios a nivel mundial que inició en Alemania y que afectó a 15 países europeos adicionalmente, con más de 3,816 personas afectadas de las cuales 54 fallecieron debido al consumo de germinado de alfalfa contaminados con la cepa EAEC ST678 serotipo O104 (Mora et al., 2011). Otro brote significativo sucedió en Japón en 1996, este implicó 9,441 casos y 12 muertes asociadas al consumo de brotes de rábano blanco contaminados con *E. coli* O157:H7 (Michino et al., 2019). Por su parte, en EE. UU., en 2018, se documentó un brote por el consumo de lechuga romana por *E. coli* O157:H7, en el cual 210 personas fueron afectadas y 5 fallecieron (Luna-Guevara et al., 2019). Como se observa en estos casos las ETAS se limitaban a enfermedades del tracto gastrointestinal; sin embargo, ha habido un incremento de reportes que asocian las infecciones extraintestinales (mayoritariamente infecciones de vías urinarias) con el consumo de alimentos contaminados con cepas de *E. coli* (Meena et al., 2021), aunque ciertamente los aislamientos han estado restringidos a los de origen animal, podría deberse a que la participación de alimentos de origen agrícola (frutas y/o vegetales) se encuentra débilmente abordado.

La plasticidad genética de *E. coli* la provee de una alta capacidad para evolucionar al ganar, perder, intercambiar y expresar genes, permitiendo la adquisición de determinantes de virulencia que *per se* implican un riesgo al consumidor. Esta plasticidad también ha involucrado la adquisición de genes que le han permitido aumentar su tasa de resistencia frente a los antimicrobianos en los últimos 20 años. El aumento de la capacidad de resistir un mayor número de antibióticos o mayores concentraciones de estos se considera multifactorial, pero se propone que en gran medida es debido a la actividad humana y al uso terapéutico con antimicrobianos en la práctica médica inadecuada humana y animal, así como en la producción de alimentos (Smit et al., 2023). En general, las cepas de *E. coli* han evolucionado para resistir la acción de las principales clases de antibióticos, como β -lactámicos, carbapenémicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, polimixina y fosfomicina mediante distintos mecanismos (Nasrollahian et al., 2024).

1.3 Resistencia a los antibióticos.

En 2022, uno de los mayores estudios sobre la resistencia a antibióticos estimó que en año 2019, 1.27 millones de muertes fueron atribuidas a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, dentro de las cuales resaltaron seis patógenos: *E. coli*, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Wagenlehner & Dittmar, 2022). Particularmente, *E. coli* resistente a los antimicrobianos se ha propuesto como indicador para monitorear la aparición y los niveles de resistencia a antibióticos clínicamente importantes como betalactámicos de espectro extendido, carbapenémicos y colistina debido a que intrínsecamente es una bacteria sensible a ellos y a su vez posee una gran capacidad para acumular genes de resistencia, principalmente a través de la transferencia horizontal (Anjum et al., 2021; Poirel et al., 2018).

Ahora bien, los mecanismos mediante los cuales *E. coli* puede manifestar resistencia frente a los antibióticos caen en una o más de estas cuatro categorías: (1) inactivación y alteración del antimicrobiano, (2) limitación en la absorción del antimicrobiano, (3) eflujo activo del fármaco y (4) modificación del sitio blanco (Reygaert, 2018) (**Figure 1.1**).

La inactivación del antibiótico es la modificación química por ruptura de la estructura química o por modificación de la estructura original por adiciones de grupos R en grupos funcionales amino o hidroxilo de las β -lactamasas en el anillo β -lactámico de dichos antibióticos; así como la alteración del fármaco puede observarse también en el cambio de los grupos hidroxilo/amino en los antibióticos por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) (De Oliveira et al., 2020).

El mecanismo que limita la entrada de antibióticos puede afectar a varios fármacos, ya que al regular la permeabilidad de la membrana externa (ME) y por otra parte aumentar la tasa de eflujo disminuye la concentración en el interior de la célula y por lo tanto su actividad, algunos ejemplos de antibióticos susceptibles a este mecanismo son las moléculas hidrófilas como los β -lactámicos, las fluoroquinolonas y las tetraciclinas (Munita & Arias, 2016) y los aminoglucosidos (Jo, Brinkman & Hancock, 2003).

Finalmente, un ejemplo de la modificación de sitio objetivo son los cambios que pueden ocurrir causados por las enzimas modificadoras del lípido A (N-Ara4N y fosfoetanolamina (pETtN)), estas agregan grupos glucosa positivamente lo que disminuye su capacidad para unirse a los péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP) reduciendo las interacciones electrostáticas, como en el caso de la resistencia a la colistina, ya que al depender de sus interacciones electrostáticas con la ME estas se reduce su efecto al cambiar la carga externa (Anandan & Vrielink, 2020).

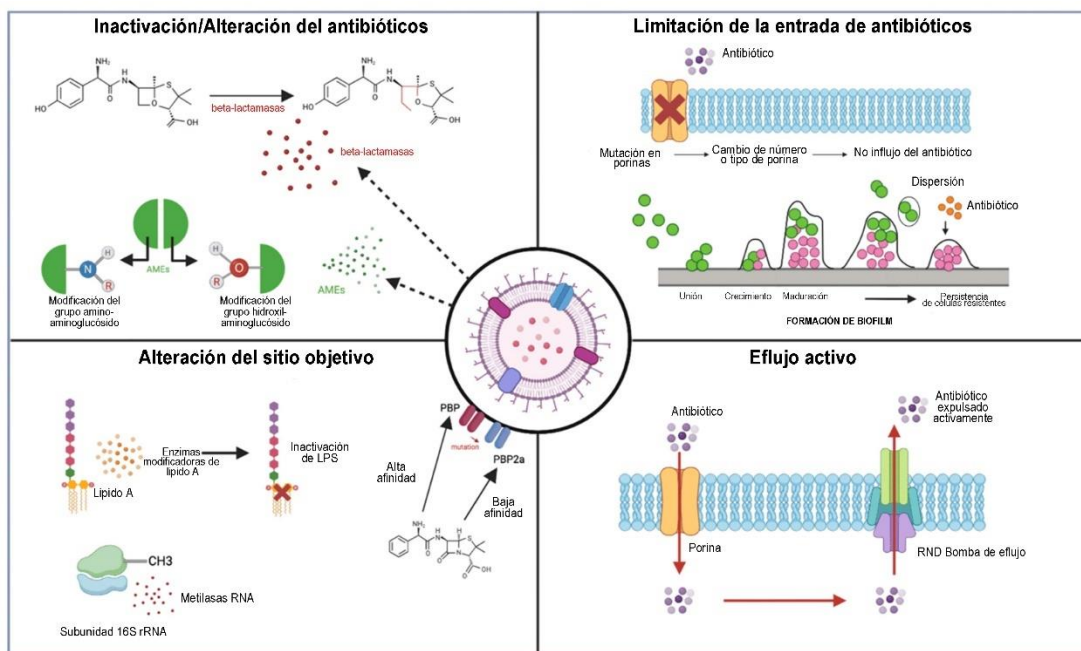


Figura 1.1 Esquemas principales mecanismos de resistencia a los antibióticos en *E. coli* (Modificada de Gauba & Rahman, 2023)

1.3.1 Antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos son los agentes antibacterianos más relevantes en todo el mundo y específicamente son los que con mayor frecuencia se emplean para tratar infecciones causadas por *E. coli* patógena (Bajaj et al., 2016). Su mecanismo de acción se centra en la inhibición de la pared celular compuesta por ácido diaminopimélico, ácido murámico, aminoácidos, carbohidratos y lípidos que dan origen a la macromolécula compleja denominada peptidoglicano (PGN), esta estructura celular es esencial para el crecimiento y desarrollo adecuado de las bacterias (Lima-Moreira et al., 2020).

Concretamente, los antibióticos β -lactámicos inhiben eficazmente la actividad catalítica de las transpeptidasas bacterianas, por lo que estas enzimas también se denominan proteínas de unión a penicilina (PBP), las cuales al unirse al anillo β -lactámico de los antibióticos forman un complejo peniciloil-enzima(3) que mediante impedimento estérico evita que se adicione el grupo amino-terminal en la unidad de pentaglicina lo que lleva a que la desacetilación catalizada por la transpeptidasa no se lleve a cabo, los que consecuentemente debilita los enlaces de Peptidoglicano provocando que la bacteria sea susceptible a la lisis y muerte celular (Bertonha et al., 2023; Wilke et al., 2005).

Ahora bien, los β -lactámicos se clasifican dependiendo de la estructura química unida al anillo β -lactámico en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, tiopenémicos y monobactámicos (**Figura 1.2**) y cada estructura condiciona su actividad a través de factores fisicoquímicos (Lima-Moreira et al., 2020).

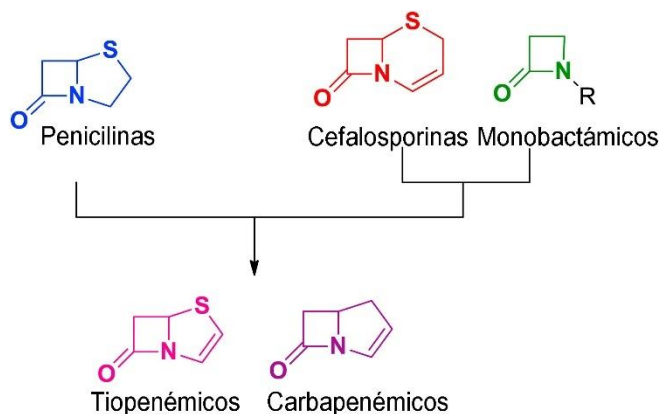


Figura 1.2 Estructuras generales de los andamiajes de los 5 tipos de β -lactámicos

(Modificada de Lima-Moreira et al., 2020).

Dentro de las penicilinas las más frecuentemente usadas son ampicilina, amoxicilina, penicilina G, meticilina (usualmente empleados en Grampositivos) y dicloxacilina. Por su parte, las cefalosporinas más habituales son la cefalexina, cefalotina, cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona. Mientras que el monobactámico más sobresaliente ha sido el aztreonam y en el caso de los carbapenémicos son imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem. Finalmente, dentro de los tiopenémicos se encuentran el feropenem y sulopenem, que se consideran relativamente nuevos (Bush & Bradford, 2016).

1.3.1 β -lactamasas.

Existen varios genes en *E. coli* de origen humano y animal que codifican enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico para formar un metabolito incapaz de unirse a las PBP dando resistencia frente a los β -lactámicos, siendo el mecanismo más común de resistencia en el grupo de las enterobacterias (Kaderabkova et al., 2022). Algunas β -lactamasas tienen un espectro reducido y únicamente inactivan penicilinas y aminopenicilinas; en contraste, algunas denominadas de espectro extendido (BLEE) y tipo AmpC son capaces de hidrolizar cefalosporinas de 3^a generación e inclusive carbapenémicos, lo que representa un riesgo importante para la salud pública (De Angelis et al., 2020).

En la actualidad, dos esquemas son los utilizados para clasificar a las β -lactamasas. La clasificación más simple se basa en la secuencia de aminoácidos y divide a estas enzimas en clase A, C y D que utilizan la serina para llevar a cabo la hidrólisis y en la clase B donde se ubican las metaloenzimas que requieren iones de zinc divalente para realizar el mismo proceso; las BLEE pertenecen principalmente a la clase A (Ambler, 1980). La segunda clasificación se basa en su funcionalidad propuesta inicialmente por Bush y ampliada por Jacoby posteriormente; esta clasificación divide a las enzimas en tres grupos (1-3) de acuerdo con los efectos de los inhibidores y la degradación de los sustratos (Bush & Jacoby, 2010). El primer grupo está asociado al grupo C y se define como cefaminasas y cefalosporinasas (ampC) resistentes al ácido clavulánico y activas contra la cefoxitina (Jacoby, 2009). El grupo 2 está integrado por las serin β -lactamasas y se agrupan dentro de la clase A y D de Ambler; también se les conoce como penicilinasas y/o cefalosporinasas ya que actúan sobre la cefotaxima, ceftazidima, aztreonam, penicilinas y cefalosporinas, aunque son inhibidas fuertemente por el ácido clavulánico y tazobactam (Philippon et al., 2019; Yoon & Jeong, 2021). Finalmente, el grupo 3 está integrado por las metalo-betalactamasas (MBL) correspondientes a la clase B, estas enzimas requieren un catión metálico divalente de Zinc para catalizar la hidrólisis de penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos y además no son inhibidas por el ácido clavulánico, pero si por EDTA (Tooke et al., 2019) (**Figura 1.3**).

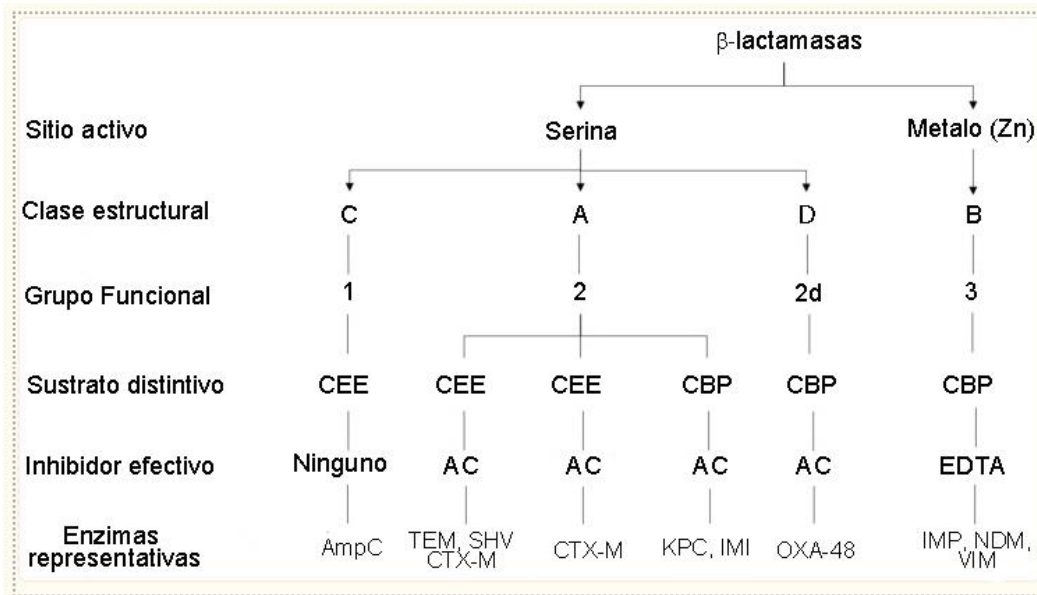


Figura 1.3 Relaciones moleculares y funcionales entre las β-lactamasas que confieren resistencia a β-lactámicos. Betalactamasas se agrupan de acuerdo con su sitio activo (serin o Zn⁺²), también pueden agruparse de acuerdo con el antibiótico que pueden hidrolizar y el inhibidor que afecta su función. CEE, cefalosporinas de espectro extendido; CBP, carbapenémicos; AC, ácido clavulánico; EDTA, ácido etilendiaminotetraacético (Modificado de De Angelis et al., 2020).

1.3.2 Resistencia a fosfomicina.

La fosfomicina es un antibiótico derivado del ácido fosfónico adicionado con un grupo epóxico activo, descubierto en 1969 como producto de varias especies de *Streptomyces*. A pesar de haberse reducido su uso en la década de 1990, la fosfomicina sigue siendo un fármaco de primera línea y se emplea como tratamiento de infecciones agudas del tracto urinario (ITU) causadas principalmente por *E. coli* multidrogoresistente (MDR) productora de BLEE (Pontikis et al., 2014). Hacia 2015 retorna su popularidad y para 2016 la OMS la clasifica como un antibiótico de importancia crítica en la medicina humana por lo que se incrementó su investigación como tratamiento para otras infecciones extraintestinales causadas por diversas bacterias MDR (Michalopoulos et al., 2010; Vardakas et al., 2016). Esto generó un gran interés en mejorar el entendimiento de los mecanismos de resistencia, la frecuencia de aislamientos resistentes y la transferencia de las determinantes genéticas frente a fosfomicina.

La fosfomicina ingresa a la bacteria a través del sistema GlpT (transportador de L-alfa glicerol-3-fosfato) y del sistema UhpT (antitransportador de glucosa-6-fosfato, G6P), ya que su estructura química imita al Glicerol-3-fosfato y G6P e inhibe la enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa (MurA) al actuar como un análogo del fosfoenolpiruvato (PEP) en las primeras etapas de la producción del peptidoglicano, lo que da como resultado una actividad bactericida (Aghamali et al., 2019; Candel et al., 2019). Así mismo, el adenilato ciclasa CyaA es responsable de la transcripción de los genes *glpT* y *uhpT*, de la misma forma que cataliza la formación de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) a partir de ATP (Castañeda-García et al., 2013). CyaA es a su vez regulada por el sistema de fosforilación PTS, integrado por tres elementos: la enzima I (PtsI), la proteína termoestable y fosforilable con histidina HPr (PtsH) y la enzima II (compuesta por los dominios EIIA Glc) (Mazé et al., 2014) (**Figura 1.4**).

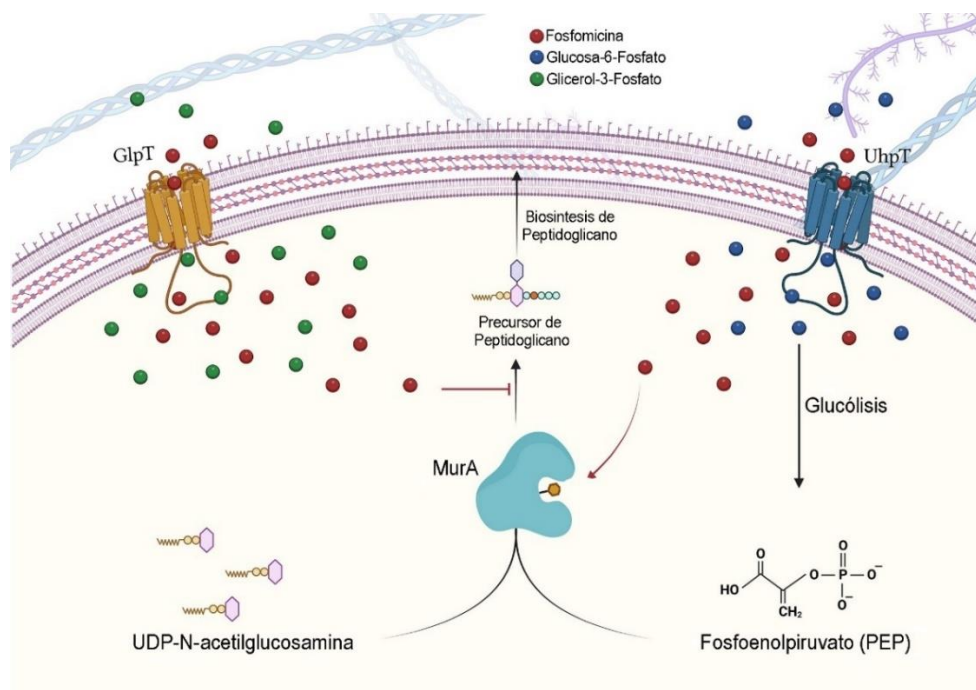


Figura 1.4 Diagrama del transporte en la célula bacteriana a través del GlpT y UhpT. Se muestran el transportador de G6P, GlpT (amarillo) y el transportador de G3P, UhpT (azul), la fosfomicina actúa como un inhibidor competitivo de MurA, que participa en la síntesis del peptidoglicano (**Modificado de Mattioni Marchetti et al., 2023**).

Históricamente, las mutaciones en los genes *glpT*, *uhpT*, *cyaA* y *ptsI* de los transportadores de nutrientes fueron los mecanismos de resistencia observados con

mayor frecuencia *in vitro* (Falagas et al., 2019); sin embargo, se ha reportado un incremento de la presencia de las metaloenzimas *fosA*, dependientes de manganeso (II) capaces de alterar el anillo epoxico de la fosfomicina. Actualmente se han descrito 11 variantes diferentes y genéticamente relacionadas (Zurfluh et al., 2020). En el caso de FosA y FosA2 han sido identificadas únicamente en el cromosoma de *Enterobacter cloacae* y *E. coli* (Xu et al., 2011). FosA3 por su parte se considera el subtipo adquirido por plásmido (Vázquez et al., 2022; Xiang et al., 2016; Zhang et al., 2020), más difundido que ha sido reportado en entornos clínicos y veterinarios incluidos perros, gatos, cerdos y bovinos, y animales silvestres, como palomas (Ho et al., 2013; Lei et al., 2020; Wachino et al., 2010).

Así mismo, las variantes FosA4, FosA5 (Guo et al., 2016; Ma et al., 2015), FosA6, FosA8, FosA9 (Ten Doeschate et al., 2019), FosA10 (Huang et al., 2021; Mattioni Marchetti et al., 2023), FosL (Kieffer et al., 2020) y FosC2 (De la Rosa et al., 2022), se han identificado en plásmidos de *E. coli* aisladas tanto de muestras clínicas como de muestras ambientales. En el caso de FosA8 se ha identificado además en *Leclercia adecarboxylata* (Poirel et al., 2019). Cabe resaltar que la variante FosA4 se ha asociado frecuentemente con la presencia de plásmidos que portan el gen *mcr* relacionado con la resistencia a colistina (Güneri et al., 2022; Loras et al., 2021; Ramadan et al., 2021).

Finalmente, la variante FosA7 al igual que FosA2 sólo se ha reportado únicamente en el cromosoma y para los subtipos FosA7.5 y FosA7.9 están estrictamente ligados al cromosoma de *E. coli* y *C. freundii*, respectivamente. (Mattioni-Marchetti et al., 2023). Particularmente, en regiones de Canadá y EE. UU. se ha informado la mayor difusión de *fosA7*, seguidas de China (Pan et al., 2021).

1.4 Plásmidos.

Otro factor agravante de la presencia de estas bacterias en la cadena alimentaria es la transmisibilidad de genes de resistencia en humanos a través de elementos genéticos móviles como los plásmidos. En 1952 Joshua Lederberg propuso el término “plásmido” para definir estructuras extracromosomales capaces de autoreplicarse de manera independiente. En la misma década se plantea que los agentes genéticos que le permiten

a las bacterias resistir los efectos de los antibióticos pueden encontrarse fuera de cromosoma y transferirse a múltiples bacterias (Watanabe, 1963), esta información permitía sugerir que ambos elementos estaban vinculados al promover el flujo genético entre especies bacterianas y que su estudio, así como su caracterización eran necesarios. Una década después se describen cuatro módulos principales en la estructura de los plásmidos: módulo de replicación, módulo de propagación, módulo de mantenimiento o permanencia y módulo de adquisición o accesorio; los tres primeros se consideran parte de la estructura intrínseca del plásmido con poca variación en sus elementos (Brovedan et al., 2020) (**Figura 1.5**).

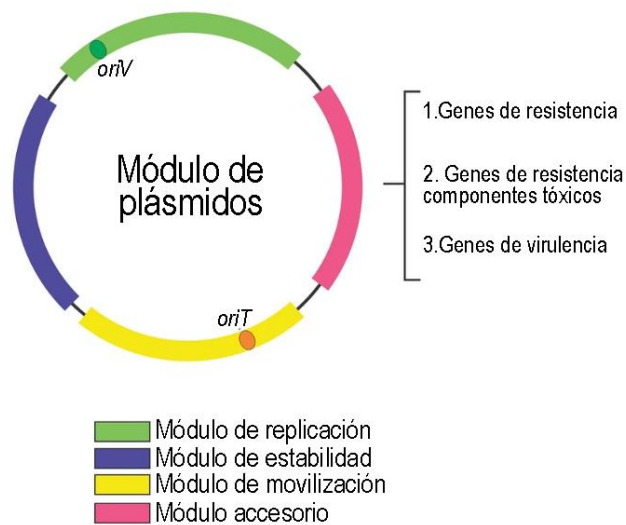


Figura 1.5 Representación esquemática de la organización de los plásmidos en módulos. Los genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos y componentes tóxicos se encuentran en el módulo accesorio y estos pueden variar de una cepa a otra (Modificada de Brovedan et al., 2020).

1.4.1 Módulo de replicación.

La replicación de los plásmidos puede llevarse a cabo por uno de tres mecanismos generales: círculo rodante (RC), desplazamiento de la hebra y mecanismos de tipo theta. Este último es por mucho el tipo predominante en *Enterobacteriaceae* (Kim et al., 2020). El primer mecanismo es frecuente en bacterias grampositivas y comúnmente tienen un tamaño por debajo de 10kb (Khan, 2005), en este proceso participan las proteínas iniciadoras Rep que se unen y escinden al origen de la replicación de doble cadena (*dso*) (que incluye las regiones *nic* y *bind*) en la hebra principal, permitiendo la generación de

un extremo 3'OH donde se une la ADN polimerasa III e inicia la replicación; posteriormente se recirculariza con ayuda de la ADN ligasa formando el primer ADN circular siendo liberada por la misma proteína Rep. La síntesis de la cadena complementaria se inicia a partir de una región denominada origen monocatenario (*ssO*) y se repite el proceso. Finalmente, la ADN ligasa y girasa de la célula huésped convierte las moléculas de ADN hijas en formas superenrolladas indistinguibles (Ruiz-Masó et al., 2024).

En el caso del mecanismo theta se caracteriza por una replicación coordinada de la hebra líder y la hebra rezagada, donde la hebra rezagada se sintetiza de forma discontinua, conduciendo a la generación de burbujas en las primeras etapas de la replicación que se asemejan a la letra griega θ (theta) y de ahí el nombre de este tipo de replicación. También este proceso puede similar a *oriC* (clase A) o dependiente de PriA (Clase B, C y D) (Lilly & Camps, 2015). En los plásmidos tipo A se forma una unión no dependiente de ATP entre la proteína Rep codificada por el plásmido con los *iterones*. Los plásmidos tipo B se caracterizan por carecer de un gen *rep*, en su lugar, la separación de las hebras de ADN y la síntesis del pre-cebador de ARN son realizadas por la ARN polimerasa bacteriana, dentro de este grupo encontramos a los plásmidos ColE1 y similares a ColE1. Mientras tanto los plásmidos de clase C tienen pequeños orígenes de replicación, además de que codifican una proteína Rep (RepA) que funciona como factor de iniciación y también participa como una primasa en el desenrollamiento de ADN. Finalmente, en los plásmidos D la replicación se inicia mediante el procesamiento de una transcripción larga, que al mismo tiempo codifica RepE que tiene un papel activo tanto en la separación del ADN como en la generación de cebadores (Kim et al., 2020; Lilly & Camps, 2015).

Por último, la replicación por desplazamiento de cadena se caracteriza por la síntesis simultánea de ambas hebras del ADN en direcciones opuestas y a diferencia del mecanismo theta, el plásmido debe codificar tres proteínas clave: la primasa RepB, la proteína RepC que inicia la replicación y la helicasa RepA (Chen et al., 2015). RepC se une a los *iterones* mientras que RepA desenrolla el ADN en ambas direcciones, de esta forma RepB reconoce a los sitios *ssI* que quedaron expuestos en las hebras de ADN y sintetiza los cebadores necesarios. El resultado es la producción de círculos de ADN de

hebra simple desplazada y círculos superenrollados de doble hebra (Giannattasio & Branzei, 2019).

1.4.2 Módulo de propagación.

Una de las principales virtudes que tienen los plásmidos y es la razón por la que su estudio es tan amplio, es la naturaleza de ser transferibles de manera horizontal lo que tiene importantes implicaciones evolutivas, ya que permite la recombinación homóloga entre dos cepas, así como la adecuación de la cepa a entornos distintos a través de la adquisición de información genética en corto tiempo (Lawrence, 1999; Smillie et al., 2010a). En bacterias existen tres mecanismos clásicos de transferencia: transformación (captación de ADN libre del medio ambiente), transducción (transferencia por partículas fágicas de bacteria a bacteria), vesiculización (nanopartículas redondeadas que funcionan como transportadores moleculares de moléculas de ADN) y conjugación, este último se considera el más común e involucra un rango más amplio de hospederos (Getino & De La Cruz, 2019; Grüll et al., 2018), por lo que en general su capacidad de movilización está determinada por su habilidad para conjugarse.

Un plásmido puede ser clasificado en tres categorías de acuerdo con su capacidad de movilización: conjugativo, movilizable y no movilizable. Esta capacidad está directamente relacionada con la presencia de los componentes de la maquinaria de conjugación presentes en el plásmido (Virolle et al., 2020). Los plásmidos conjugativos contienen los cuatro elementos: 1) la relaxasa, una proteína que reconoce y escinde la región denominada origen de transferencia (*oriT*), 2) el *oriT*, es una región con una secuencia corta de ADN en *cis* en una de las hebras a la cual la relaxasa permanece unida covalentemente, formando el relaxosoma 3) la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP) involucrada en la conexión entre el relaxosoma (MOB) y el canal de transporte y 4) los componentes del canal de apareamiento (MPF) que ensamblan un sistema de secreción tipo IV (SST4) (Smillie et al., 2010a). Los plásmidos movilizables únicamente contienen a la relaxasa y al *oriT*, esto les permite transferirse utilizando los componentes faltantes que provengan de otro plásmido. Finalmente, los plásmidos no movilizables carecen de

alguno de los elementos restantes, aunque pueden transferirse por otro mecanismo diferente a la conjugación (Coluzzi et al., 2022) (**Figura 1.6**).

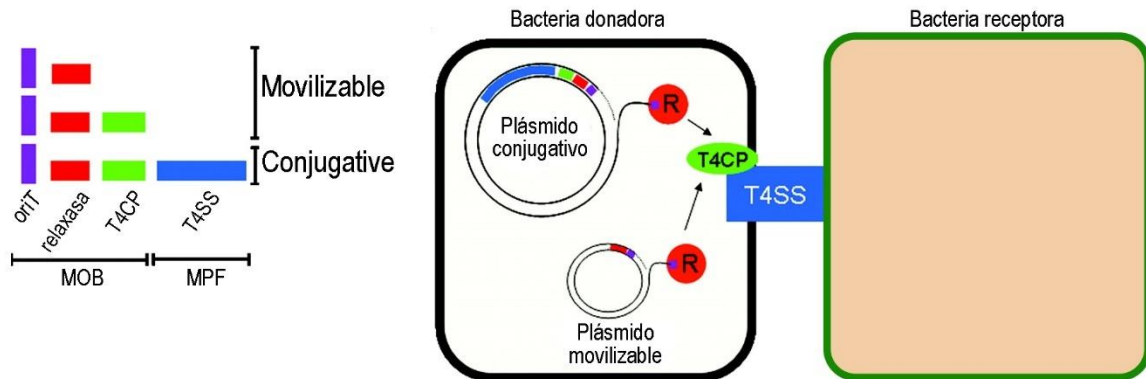


Figura 1.6 Vista esquemática de la constitución genética de los plásmidos transmisibles. Se muestra la bacteria donadora con los cuatro elementos de la maquinaria de conjugación (*oriT*, *relaxasa*, sistema de secreción tipo IV (SST4), proteína de acoplamiento IV (T4CP)) (circunferencia negra), la bacteria receptora se ubica a la derecha sin elementos de conjugación) (circunferencia verde) (Modificada de (Smillie et al., 2010a))

1.4.3 Módulo de mantenimiento o permanencia.

La permanencia de los plásmidos en las bacterias en gran medida es dependiente del beneficio que aporte a la sobrevivencia y/o desarrollo de la célula y por lo tanto está vinculada a las condiciones ambientales donde antibióticos o metales pesados estén presentes (Galetti et al., 2019); no obstante los plásmidos pueden codificar elementos que les permiten permanecer en la bacteria a pesar de no ser necesarios, incluyendo el mecanismo de partición activa y los mecanismos de supervivencia denominados sistemas de adición que promueven la muerte de células hijas libres de plásmidos (Wein & Dagan, 2020).

Los sistemas de partición activos garantizan una segregación precisa de cromosomas y de plásmidos con bajo número de copias, es decir, se aseguran de que cada célula hija posea una copia de estas moléculas (Baxter & Funnell, 2015). Estos sistemas usualmente están integrados por ParA (ATPasa de partición), ParB (la proteína de sitio específico hélice-giro-hélice (HTH) que se une al centrómero) que forman un complejo

alrededor de *parS* (el centrómero o sitio de partición) durante la replicación, las dos copias son separadas, los posiciona en lugares específicos dentro de la célula e impulsa cada uno hacia cada célula, esto permite que cada célula hija reciba al menos una copia después de la división celular (Funnell, 2016; Patricia Siguier et al., 2023).

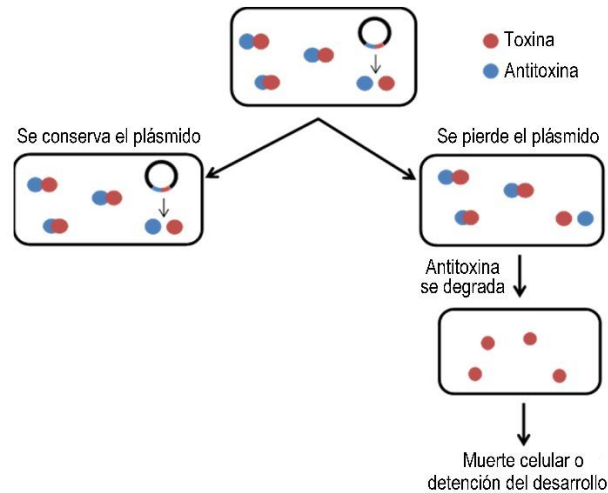


Figura 1.7 Mecanismo de mantenimiento de plásmidos de sistemas Toxina-Antitoxina a través de la muerte post-segregacional o el arresto del crecimiento bacteriano. La toxina se muestra en rojo y la antitoxina se muestra en azul, mientras que la célula que conserva el plásmido se mantiene viable; la célula carente del plásmido comienza el proceso de muerte celular (Modificado de Kamruzzaman et al., 2021).

Mientras, los sistemas de adición (SAP) se les conoce de esta forma porque su único propósito en el plásmido es replicarlo sin importar el costo para el hospedero, provocando la muerte post-segregacional (Fedorec et al., 2019); este tipo de sistema es especialmente útil cuando se trata de plásmidos grandes con un número bajo de copias y se caracteriza por codificar una toxina estable que se mantiene durante y después de la división celular y una antitoxina inestable que requiere se sintetice continuamente, en ausencia del plásmido hay un exceso de toxina que no es neutralizada por la antitoxina y la bacteria muere (Kamruzzaman et al., 2021). En la actualidad, se han reportado siete tipos de sistemas toxina-antitoxina (TA) en plásmidos y cromosomas; sin embargo, los más estudiados son los sistemas de tipo II, los cuales principalmente se dividen en tres categorías de acuerdo con la naturaleza de la antitoxina: (1) sistemas regulados por proteínas (*ccdAB*, *pemKI*, *relEB*, *parDE*, *vagCD*), (2) sistemas regulados por ARN

antisentido (*hok-sok*, *pndAC* y *srnBC*) y (3) sistemas de modificación por restricción (EcoK McrBC) (Kamruzzaman et al., 2021; Tsang, 2017).

1.4.4 Módulo de adquisición o adaptabilidad.

Esta sección también se conoce como “módulo accesorio” y está caracterizado por albergar genes de virulencia, de resistencia a antibióticos y/o genes que participan en las vías para el metabolismo o degradación de compuestos xenobióticos (Brovedan et al., 2020). Usualmente los genes del módulo de adaptabilidad se encuentran flaqueados por otros EGM, como secuencias de inserción (IS), tranposones (Tn), integrones (In) e inclusive islas genómicas (IG) que promueven el intercambio genético extracelular e intracelular, facilitando el reordenamiento y contribuyendo a la propia evolución y sobrevivencia de la célula bacteriana que lo hospeda (Partridge et al., 2018).

1.4.5 Sistemas de clasificación de plásmidos.

La clasificación es una tarea inherente al análisis de la biología; en este caso la identificación y caracterización de los plásmidos en detalle proporciona información relevante sobre la influencia que tienen en el funcionamiento de la célula hospedera y las estrategias que usa para llevar a cabo su transmisión (Garcillán-Barcia et al., 2011). Por otro lado, la clasificación resulta benéfica porque facilita el seguimiento de la evolución del plásmido en la comunidad (Garcillán-Barcia et al., 2023). En conjunto, todas las clasificaciones son efectivas para comprender y predecir las características de plásmidos establecidos o desconocidos. A lo largo de la historia diversas formas de categorizarlos han surgido, de manera inicial se propuso la clasificación en tres grupos: (1) factor F (plásmidos de fertilidad F y sus derivados), (2) factores Col (plásmidos que codifican toxinas de colicina) y (3) factores R (determinantes de resistencia); sin embargo, de manera gradual comenzaron a ser abandonados (Chen et al., 2024).

El sistema de grupos de incompatibilidad (Inc) se estableció mediante pruebas de incompatibilidad en las cuales se introdujeron dos plásmidos por conjugación en un plásmido y se midió la estabilidad y permanencia de cada uno dentro de la célula

hospedera (Data & Hedges, 1971); con base a los resultados se observó que determinado grupo de plásmidos que compartieron uno o más elementos del sistema de replicación, no podrían permanecer de forma estable en la misma célula (Novick, 1987). En general en la familia de Enterobacterales se han determinado más de 30 Inc, aunque hay varios plásmidos que no ha sido relacionados con alguno (Chen et al., 2024); no obstante, un número importante de los elementos identificados en *E. coli* pertenecen al grupo IncF que puede subclasificarse con base en su variación alélica como FII, FIA y FIB (FAB), este grupo es heterogéneo en cuanto a tamaño y características, además, se encuentran vinculados frecuentemente con el acarreo de genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Yang et al., 2015).

Si embargo, establecer los ensayos de incompatibilidad representó una limitante ya que existían una gran cantidad de factores que pudiera condicionar la transferencia de estos elementos y no necesariamente porque fueran incompatibles, por lo que este esquema fenotípico no parecía funcionar de manera ideal para el análisis de su epidemiología. Esta limitante, generó el desarrollo de la tipificación de replicones mediante PCR (PBRT) basado en que se considera que todos los plásmidos tienen al menos un origen de replicación. Actualmente se conocen 142 secuencias de replicones asociadas a la familia Enterobacteriaceae de los cuales 32 (HI1, HI2, HIB-M, I1- α , I2, X1, X2, X3, X4, M, N, FIA, FIB, FIC, FIIS, FII, FIik, FIIY, FIBS, FIBK, FIB-M, W, Y, P1- α , A/C, T, L, K1, K2, B/O, R, U y Z) frecuentemente se encuentran *E. coli*. Por otra parte, aunque este sistema es funcional, la asignación se vuelve compleja ante la presencia de plásmidos con varios replicones (Carattoli et al., 2005).

Más adelante, los plásmidos transferibles se clasificaron de acuerdo con la relaxasa, la proteína que participa en la escisión del *oriT* durante el proceso de conjugación (Garcilán-Barcia et al., 2009). Esta proteína se encuentra en todos los plásmidos movilizables y rara vez se encuentran dos relaxasas en un mismo plásmido (Garcillán-Barcia et al., 2019). Actualmente se han reportado nueve clases de MOB ((MOB_F, MOB_P, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_V, MOB_T, MOB_B y MOB_M), pero sólo seis se han sido halladas en la clase Proteobacteria (Villa et al., 2010). Se ha diseñado tres sistemas de clasificación basados en relaxasas: (1) “Degenerate Primer MOB Typing” (DPMT), (2) MOBSCAN: basado en

la homología de las relaxasas, generando una base de datos HMM de perfiles de relaxasas seleccionadas utilizando únicamente el dominio de relaxasas (300 aminoácidos N-terminales) y (3) MOBSuite: basado en secuencias completas de relaxasas, reconstrucción y tipificación a partir de ensamblaje preliminares (Garcillán-Barcia et al., 2009; Garcillán-Barcia et al., 2020; Robertson & Nash, 2018). Este sistema proporciona un marcador evolutivo para plásmidos conjugativos y movilizables; sin embargo, los plásmidos no movilizables son excluidos por carecer relaxasa.

Recientemente, se ha propuesto un sistema mediante las unidades taxonómicas de plásmidos (PTU) el cuál utiliza las métricas de identidad de nucleótidos promedio (ANI); esto quiere decir que las PTU son grupos que comparten estructuras genéticas y por lo tanto representan una relación filogenética cercana (Redondo-Salvo et al., 2021b); sin embargo, al igual que esquemas anteriores presentan un porcentaje entre el 10-15% de plásmidos no asignados a ninguna categoría (Lipworth et al., 2024). Así mismo, es interesante observar algunas discrepancias de la clasificación previa, por ejemplo, pWW0 y NAH7, plásmidos representativos de IncP-9 que contienen genes degradativos de tolueno (pWW0) o genes degradativos de naftaleno (NAH7), no han sido clasificados en la misma PTU (Tokuda & Shintani, 2024).

Finalmente, los plásmidos también pueden clasificarse con base a su rango de hospedero; los plásmidos de rango de hospedero estrecho (RHE) son aquellos que pueden replicarse y mantenerse en un hospedero único o bien en un grupo estrechamente relacionado a su hospedero inicial. Mientras que un plásmido de amplio rango de hospedero (RHA) puede mantenerse y replicarse en una vasta variedad de hospederos bacterianos (Klümper et al., 2015). Particularmente la importancia de los plásmidos RHA radica en que juegan un papel importante en la transferencia horizontal de genes, esto los convierte en candidatos excelentes como vectores en la ingeniería biotecnológica (Yang et al., 2023); por ejemplo, los plásmidos pCU1 (IncN) y pRK2 (IncP) son capaces de replicarse entre casi todas las especies de proteobacterias Alfa, Beta y Gamma (Pohlman & Figurski, 1983). Algunos factores que determinan el rango de hospedero de un plásmido son: (1) La presencia de múltiples orígenes de replicación, (2) inicio de la replicación independiente de los factores de inicio del huésped y (3) escasa

presencia de enzimas de restricción, esto permite que los plásmidos eviten las barreras de restricción de la célula hospedera (Jain & Srivastava, 2013).

1.5 Otros elementos genéticos móviles

1.5.1 Secuencias de inserción y transposones.

Los elementos transponibles (ET) se definen como secuencias de ADN que pueden moverse de una ubicación a otra en el genoma. Particularmente los transposones son elementos genéticos móviles que pueden moverse de un plásmido a otros plásmidos o de un cromosoma a plásmido y viceversa, por lo que han desempeñado un papel importante en la evolución de muchos genomas (Blot, 1994). Los transposones se dividen en dos grupos principales: retrotransposones (clase I) que se encuentran particularmente en células eucariotas y los transposones de ADN (clase II) estos son los que se encuentran en células bacterianas y pertenecen a la familia Tn, vinculados frecuentemente con el acarreo de genes adicionales para la resistencia a los antibióticos. (Babakhani & Oloomi, 2018). Dentro de este último grupo se definen cuatro categorías (1) Secuencias de inserción (SI), este grupo está compuesto por cinco familias (IS1, IS3, IS4, IS5 y IS6) y se conoce que *E. coli* alberga múltiples copias de SI (Ooka et al., 2009), (2) transposón compuesto, que a diferencia de la SI, adicionalmente portan al menos un gen asociado a la resistencia a antibióticos, (3) familia TnA, este grupo no termina con una SI y lleva un TIR (repetición terminal invertida) de 38pb y (4) Mufago, este es único ya que es capaz de insertarse en el genoma de *E. coli* al azar en la etapa lisogénica (Wu et al., 2022)(Figura 1.8).

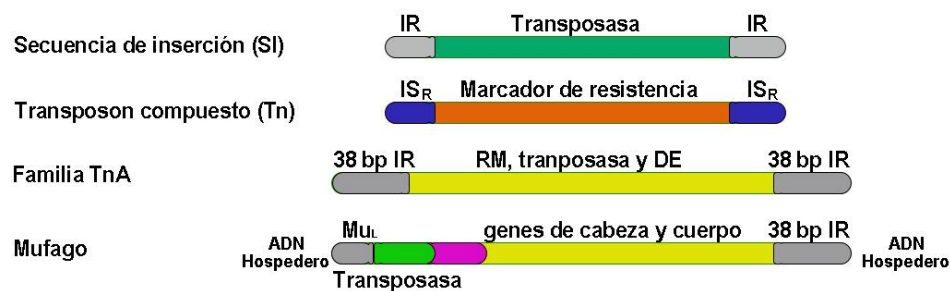


Figura 1.8 Clasificación y mecanismos de transposición de transposones. Clasificación y estructuras de transposones bacterianos (Modificado de Wu et al., 2022).

1.5.2 Integrones

Los íntegrones contienen un sistema de recombinación de sitio específico capaz de integrar e intercambiar fragmentos específicos de ADN, llamados casetes genéticos que codifican múltiples genes, incluidos los genes de resistencia a los antibióticos (Sabbagh et al., 2021). Propiamente estos elementos no son móviles de manera autónoma, lo que lleva a necesitar de elementos como transposones, secuencias de inserción o plásmidos para llevar a cabo esta función (Hall & Collis, 1995). Los integrones están compuestos por cuatro elementos: (1) el gen que codifica una tirosin recombinasa (integrasa, codificada por el gen *intl*), (2) el sitio recombinante adyacente (*attI*) que es reconocido por la integrasa y se encuentra corriente arriba de *intl*, (3) el promotor (Pc) sirve para la transcripción y expresión eficiente de todo el integrón y (4) el casete genético que se encuentran entre la zona 3' y 5' entre dos sitios de recombinación (*attI* y *attC*) ((Hall, 2012; Xu et al., 2011).

La clasificación de los integrones está basada en la relación filogenética de su integrasa, los miembros que poseen la misma pertenecen a la misma clase, pero pueden llevar casetes diferentes. Hasta ahora se han identificado nueve clases de integrones en bacterias gramnegativas pero sólo 4 se han asociado con aislados clínicos, aunque el cuarto sólo se ha reportado en *Vibrio cholerae* (Bhat et al., 2023; Sabbagh et al., 2021). Los integrones de clase I y clase II son las clases más comunes entre los aislados clínicos (Sabbagh et al., 2021), principalmente los integrones clase I se asocian frecuentemente con plásmidos movilizables y su prevalencia en Gramnegativas es del 22 al 55% (Deng et al., 2015). En la estructura del *IntI1* el segmento 3'-conservado está constituido por los siguientes componentes: el gen *qacEΔ1* relacionado con la resistencia a sales de amonio cuaternario, el gen *sul1* que codifica a la resistencia a las sulfonamidas y el *orf5* asociado con una función de acetiltransferasa (Bissonnette & Roy, 1992). Por otra parte, la estructura del integrón clase II incluye los genes *dfrA1* (dihidrofolato reductasa), *sat1* (estreptotricina-acetil transferasa) y *aadA1* (aminoglucósido adeniltransferasa) que codifican la resistencia a trimetoprima, estreptomina y estreptomina/espectinomicina, respectivamente (Bhat et al., 2023) (**Figura 1.9**).

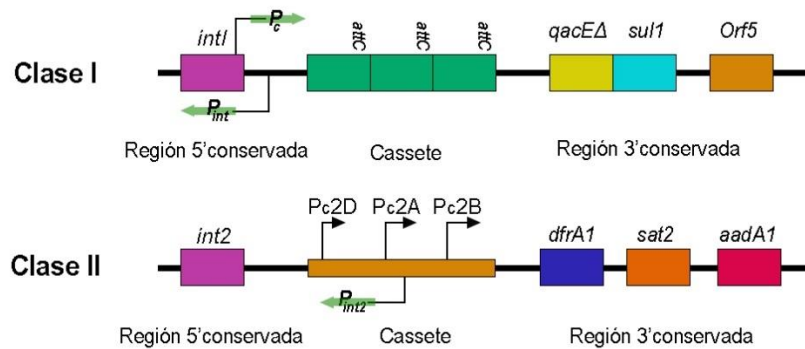


Figura 1.9 Estructura general de los elementos de los integrones clase I y clase II. Las integrasas se muestran en color morado, la región 3'conservada se caracteriza por poseer diferentes genes de resistencia a antimicrobianos y desinfectantes (*qacEΔ*) (Modificada de Sabbagh et al., 2021y Lu et al., 2022).

1.6 Formación de biopelícula.

La biopelícula es una estructura de colonias microbianas embebidas en una matriz polimérica extracelular (EPS) autosecretada que se encuentra altamente hidratada, lo que propicia un entorno idóneo para que las células se adhieran entre sí y sobre superficies bióticas y abióticas de manera irreversible (Zhou et al., 2022). Además, provee a las colonias bacterianas de resistencia frente los antibióticos, la luz UV, los biocidas químicos, la respuesta inmune del huésped y otras tensiones adversas, como temperatura y pH extremos, alta salinidad, presión y nutrientes pobres, actuando como una barrera (Yin et al., 2019). Así mismo, la formación de biopelículas se ha asociado con distintas superficies en ambientes alimentarios, sanitarios y hospitalarios relacionándose frecuentemente con microorganismos patógenos y bacterias MDR (Assefa, 2022).

En la producción alimentaria las prácticas de limpieza insuficientes o ineficientes permiten que residuos orgánicos permanezcan en los equipos e instrumentos facilitando la adhesión bacteriana y por consiguiente la formación de biopelículas y su persistencia los que puede provocar ETAs o promover la descomposición de los alimentos al reducir su vida de anaquel (Flemming et al., 2016). Mientras que en los entornos clínicos las bacterias pueden desarrollar biopelículas en superficies del material o equipo médico, de

hecho, muchas de las infecciones intrahospitalarias del tracto urinario y del torrente sanguíneo se asocian con este tipo de material (Bhatta et al., 2018). Así mismo, se ha reportado que las biopelículas les permiten a las bacterias evadir las defensas inmunes innatas y adaptativas provocando infecciones crónicas causantes de inflamación permanente y daño en el tejido (González et al., 2018). Además, las enfermedades asociadas con cepas formadoras de biopelículas presentan un aumento en sus tasas de morbilidad y mortalidad de los pacientes y un aumento en las estadías hospitalarias (Del Pozo, 2018; Donlan, 2001). Tan sólo en 2019 se estimó que los microorganismos formadores de biopelículas fueron responsables de más de 65% de las infecciones intrahospitalarias y 80% de las infecciones crónicas (Preda & Sandulescu, 2019).

De igual forma, diversos estudios han señalado que las biopelículas desempeñan un papel importante al facilitar la aparición de resistencia a los antimicrobianos hasta 10-1000 veces en comparación con sus contrapartes planctónicas (Høiby et al., 2010). Su constante aparición en conjunto ha sugerido una posible correlación entre la resistencia antimicrobiana y la capacidad de formación de biopelículas (Ćwiek et al., 2020). Además, se consideran actualmente como puntos calientes para la transferencia de genes (THG) y por lo tanto un nicho ideal para la diseminación de genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Michaelis & Grohmann, 2023; Vyas et al., 2022).

1.6.1 Formación de biopelícula en *E. coli*.

La formación de biopelículas es un proceso que ocurre en cuatro diferentes etapas: (1) unión reversible, (2) adhesión irreversible, (3) maduración y (4) dispersión. Este proceso es dependiente de cambios en los nutrientes, la temperatura, la presión osmótica, el pH y otros factores del medio ambiente (Watnick, 2000)(**Figura 1.10**)

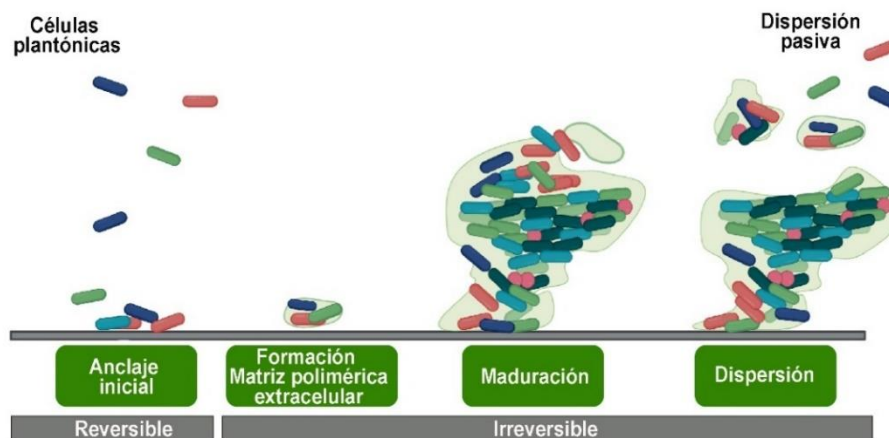


Figura 1.10 Etapas de la adhesión de la biopelícula microbiana. Las células planctónicas se muestran dispersas antes de comenzar la formación de la matriz polimérica extracelular. El último estadio es la dispersión, puede suceder de manera pasiva o activa mediante abrasión en la superficie (Modificada de Brito et al., 2022).

En la unión reversible, *E. coli* recibe señales ambientales y utiliza a los flagelos para acercarse a la superficie superando las fuerzas repulsivas entre la bacteria y la superficie lo que le permite fijarse (Belas, 2014). Además, otros orgánulos clave involucrados en la adhesión inicial son las fimbrias y los curli (Zhou et al., 2022).

En la segunda fase, *E. coli* cuenta con la capacidad de analizar su entorno adyacente y realizar la transición de la adhesión reversible a la irreversible. Esta etapa se caracteriza por la secreción de la matriz polimérica extracelular (EPS) compuesta por proteínas, lípidos, lipopolisacáridos y ácidos nucleicos que le permite funcionar como una barrera protectora (Shrestha et al., 2016). Para llevar a cabo esta unión irreversible, *E. coli* utiliza elementos como las fimbrias tipo curli, definidas como estructuras amiloides que facilitan la adhesión celular y que son codificadas por los operones *csgABC* y *csgDEFG* (Böhning et al., 2024). También encontramos a los pili conjugativos y a las fimbrias tipo 1, estas últimas codificadas por el operón *fimAICDFGH*. Particularmente la proteína FimH puede unirse a la manosa debido a su dominio de lectina, lo que le permite a *E. coli* unirse a la manosa de células eucariotas, EPS y superficies abióticas (Capitani et al., 2006).

La tercera etapa inicia cuando aumenta la densidad de la biopelícula ya que *E. coli* crece y se multiplica para formar colonias, aumenta significativamente el EPS formando un gel en la superficie y se habilita la activación de la señalización para detectar el quórum

(Quorum-sensing, un mecanismo de comunicación celular en las bacterias) (Laganenka et al., 2016). Este crecimiento celular permite que la biopelícula crezca de manera tridimensional ya que los polisacáridos (poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) y la celulosa está constituida por un homopolisacárido lineal de β -1 \rightarrow 4 unido a D-glucosa) proporcionan estabilidad a través de enlaces covalentes (Itoh et al., 2008).

Finalmente, la fase de dispersión promueve el desprendimiento de bacterias lo que permite su esparcimiento en el medio ambiente y su consecuente colonización de nuevas superficies. En la dispersión activa las bacterias escapan a través de la degradación enzimática, dejando biopelículas erosionadas. Por su parte el desprendimiento pasivo se debe a fuerzas externa como perturbación humana o abrasión (Kaplan, 2010).

2. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

A nivel global, los productos frescos como vegetales y frutas han ganado popularidad debido al incremento de su consumo en dietas más saludables que combinan una baja densidad energética; no obstante, estos productos al consumirse crudos también representan un reservorio para microorganismos principalmente bacterias gramnegativas asociadas a ETAs. En los últimos años han aparecido cada vez con mayor frecuencia reportes en todo el mundo de bacterias resistentes a varios antibióticos incluidos los de última elección que se han vinculado al consumo de productos frescos; por ejemplo, en 2018, Freitag y colaboradores en Alemania tomaron 245 muestras de vegetales en un periodo entre 2011-2013, de las cuales se aislaron siete cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Los aislamientos pertenecen al ST973 y ST527, poseen plásmidos conjugativos IncK e IncHI portadores de genes *bla*_{CTX-M-14}, IncFIB acarrea *bla*_{CTX-M-15}, IncN con *bla*_{CTX-M-65} e IncH2 con *bla*_{CTX-M-125}. Varios de estos plásmidos portaban otros genes asociados a la resistencia a sulfonamidas (*sul2*), aminoglucósidos (*strA* y *strB*), quinolonas (*qnrS1*) y fosfomicina (*fosA3*) (Freitag et al., 2018).

Posteriormente, en 2019 en Nepal, Sapkota y su equipo analizaron 216 muestras de ensaladas comercializadas en hoteles y restaurantes. Se detectaron 4 aislamientos de *E. coli* MDR y productoras de BLEE, de las cuales tres fueron identificados como *E. coli* O157:H7. (Sapkota et al., 2019). Por su parte, Lui y colaboradores en este mismo año en China, reportaron dos aislamientos de *E. coli* MDR procedentes de colza (una planta parecida a la canola) y espinaca que albergaron simultáneamente los genes *mcr-1* y *bla*_{NDM-5/9}, respectivamente. El gen de resistencia a la colistina se encontró en los plásmidos IncX4 y IncI2, mientras que el gen *bla*_{NDM-5} lo reportaron en el plásmido IncX3 y el gen *bla*_{NDM-9} en un plásmido no tipificable (Liu & Song, 2019).

En 2020, Oh y colaboradores en Corea del Sur detectaron un aislamiento de *E. coli* ST10 MDR portadora de los genes *mcr-1* y *bla*_{CTX-M-15} proveniente de lechuga. Ellos sugieren que este hallazgo es debido al contacto con animales destinados a la alimentación lo que podrían representar un peligro importante en la transmisión directa a los humanos a través de la cadena alimentaria (Oh et al., 2020). Más adelante, en ese mismo año Song y su equipo recolectaron 1324 muestras de vegetales en mercados minoristas.

Identificaron 11 cepas de *E. coli* que eran resistentes a ampicilina, piperacilina, cefazolina, cefotaxima, ácido nalidíxico y se reportaron como productoras de BLEE. Además, mediante PCR se identificaron las variantes CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-55, CTX-M-27 y CTX-M-65 (Song, Oh, Kim, & Shin, 2020). De igual forma, este mismo año, se reportó un aislamiento de *E. coli* ST1716 proveniente de lechuga producida y comercializada en Portugal, que albergó un plásmido IncHI2 que acarrió el gen *mcr-1* relacionado a la resistencia a la colistina flanqueado por IS26; adicionalmente la cepa portó genes asociados a la resistencia de aminoglucósidos (*aadA1*, *aph(4)-Ia*, *aph(6)-Ib*, *aac(3)-IV*), macrólidos (*mdfA*), fenicoles (*floR*), tetraciclinas (*tetA*) y sulfonamidas (*sul2*) (Manageiro et al., 2020).

En 2021, Priyanka y colaboradores, recolectaron 830 muestras de verduras de hoja verde, de las cuales se recuperaron 117 cepas MDR de *E. coli*, 40 identificadas como diarrogénicas y 77 como no diarrogénicas. Así mismo, reportaron una resistencia de moderada a alta (30-90%) para amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, gentamicina y colistina y una resistencia relativamente baja (>30%) para ciprofloxacino, trimetoprima/sulfametoxazol y fosfomicina (Priyanka et al., 2021). En ese mismo año, Kurritu y su equipo en Finlandia, analizaron 60 muestras de verduras provenientes de 16 países diferentes de Europa y Asia, en estas se identificaron dos cepas de *E. coli* (ST155 y ST479) MDR productoras de BLEE aisladas de cilantro producido en Malasia. Mediante secuenciación del genoma completo se identificaron los genes *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib*, *aph(4)-Ia*, *aph(6)-Ib*, *aac(3)-IV* y *aadA5*, asociados a la resistencia contra los aminoglucósidos, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{TEM-1B} y *bla*_{CTX-M-65}, relacionados con la resistencia a betalactámicos, *oqxA* y *oqxB* asociados a las quinolonas, *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con las sulfonamidas, *dfrA14* y *dfrA17* asociado a la resistencia a trimetoprim y *tetA* con las tetraciclinas. Aunado a esto se identificaron los replicones IncFIB, IncFII y p0111 que habían sido descritos en otros trabajos como conjugativos (Kurittu et al., 2021). Un año después, Chelaghma y colaboradores en Argelia identificaron cepas 16 cepas de *E. coli* *bla*_{TEM} positivas y 11 cepas *bla*_{CTX-M-15} positivas, pertenecientes a ST101, ST216 y ST2298. Además, cinco aislamientos portaron genes de carbapenemasas (*bla*_{OXA-48} y/o *bla*_{VIM-4}) y dos más poseían *mcr-1*. Posteriormente, mediante ensayos de conjugación se confirmó la capacidad de transferencia de los genes *bla*_{OXA-48} y *mcr-1*. (Chelaghma et al.,

2022). Mientras tanto en Estados Unidos, Moon y colaboradores recolectaron 88 muestras de verduras que incluyeron brotes de verduras, lechuga, hierbas, espinaca, hongo, col, col rizada, perejil y ensalada mixtas. Dos de las muestras fueron positivas para la presencia de Enterobacterales productores de AmpC y ocho cepas pertenecientes a los géneros *Escherichia* (3), *Enterobacter* (2), *Serratia* (2) y *Pseudomonas* (1) fueron productoras de BLEE y mediante secuenciación del genoma completo se identificaron los genes *bla_{SHV-66}* y *bla_{FONA-5}* en *Escherichia* y *Enterobacter*, (Moon et al., 2022).

Por otra parte, el grupo de Habib, en el 2023 reportó un estudio en el cual tomaron 400 muestras de productos frescos (rúcula, repollo, cilantro, eneldo, nueve variedades de lechuga, hojas de cebolla, perejil, espinaca y paquetes mixtos) utilizados en ensaladas comercializadas por minoristas en los Emiratos Árabes. Se aislaron 145 cepas de *E. coli* que exhibieron resistencia fenotípica a la ampicilina (20,68%), tetraciclina (20%) y trimetoprima-sulfametoxazol (10,35%). En total 20 cepas fueron MDR, de las cuales se seleccionaron 18 cepas y se sometieron al análisis del genoma completo, mediante el cual se observó que el 50% (9/18) de las cepas albergaron al gen *bla_{CTX-M-15}* y además en general albergaron de 8 a 25 genes de virulencia por genoma, siendo los genes más prevalentes *csgA*, *hlyE*, *fimH*, *iss*, *afa*, *iuc* y *esp* vinculados tanto a patotipos intestinales como a extraintestinales (Habib et al., 2023). Por su parte en China, en ese mismo año se reportó por el equipo de Cao, que al muestrear 575 vegetales (tomates, espinacas, lechugas y coles) se identificaron cinco cepas de *E. coli* MDR (O101:H4, O8:H18 y O11:H25). Un aislamiento que fue recolectado de espinacas presentaba resistencia a cefalosporinas de tercera generación, así como la producción de BLEE (Cao et al., 2023). De manera similar, en India se recuperaron 77 ExPEC, después de analizar 1780 muestras de vegetales (pepino, zanahoria, tomate, rábano, chile, cilantro, menta, cebolla, repollo y espinaca), el 23.3% de las cepas se identificaron como UPEC y el 24.6% como SEPEC, de manera interesante el 29.8% fue clasificado como híbrido UPEC-SEPEC y finalmente el 22% se mostró indefinido debido a fallas en los criterios utilizados para definir un patotipo ExPEC determinado; la mayoría se clasificó dentro los linajes filogenéticos A, D/E, B1 y clado 1. Así mismo, el 100% de las cepas fueron resistentes a múltiples antibióticos enlistando a los de primera línea como nitrofurantoina,

sulfametoxazol, ampicilina y gentamicina seguidos de la colistina utilizada en infecciones ocasionadas por bacterias Gramnegativas resistentes a múltiples antibióticos (Priyanka et al., 2023).

En 2024, en China, Sun y su equipo, identifican 48 aislamientos de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas (levofloxacino y ácido nalidíxico) provenientes 157 muestras de vegetales (repollo, tomate, tomate cherry, pepino, espinaca, lechuga, lechuga romana, apio y cilantro). Veintiocho aislamientos fueron productores de BLEE en los cuales se identificaron los genes *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-123}, *bla*_{CTX-M-24}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{LAP-2} y *bla*_{OXA-1} y *bla*_{TEM-1b}. Resaltando que 17 de estos aislamientos contenían simultáneamente *bla*_{TEM-1b} y *bla*_{CTX-M} frecuentemente acarreados en plásmidos IncF (IncFIA, IncFIB e IncFII), IncI-1 y p0111 de manera decreciente. Además, se identificó que el 75% de los aislamientos contenían >10 secuencias de inserción por genoma. Así mismo reportan que el 2.6% de los aislamientos provenientes de vegetales fueron resistentes a fosfomicina, mientras que frutas fue del 16.5% (Sun et al., 2024). También, en China Lu-Chao y colaboradores recuperaron siete aislamientos de *E. coli* (ST10, ST93, ST206, ST746, ST6736, ST7058 y ST7458) provenientes de col, zanahoria, pepino, espinaca y brócoli. Todas las cepas fueron descritas como MDR y portaban el gen *bla*_{NDM-5}. De los siete aislamientos de *E. coli*, sólo uno no mostró la capacidad de transferir el plásmido en el que se albergaba el gen *bla*_{NDM-5}, entre los seis restantes, cuatro portaron plásmidos tipo IncX3 y dos portaban plásmidos tipo IncHI2 (Lv et al., 2024). Finalmente, Rueda-Furlan y colaboradores en 2024 en Brasil reporta un aislado de espinaca de *E. coli* ST155 MDR portadora de *bla*_{NDM-1} además de *bla*_{PER-2}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1B}, *qnrVC1*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aadA1*, *aadA2b*, *tetA*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA6*, *cmlA1*, *catA2*, *catB3* y *arr-3*. También identificaron los replicones IncC, IncFIB, ColpVC, ColRNAI, Col440I, Col440II, Col (MG828) y Col(pHAD28) en las cepas aisladas (Furlan et al., 2024).

3. ANTECEDENTES NACIONALES.

En México, los análisis de cepas de *E. coli* MDR en alimentos son escasos, ya que la bacteria es considerada en primera instancia únicamente como indicador de la calidad sanitaria y solamente toma relevancia cuando se relaciona a un patotipo diarreagénico específico asociado a ETAs.

En 2010, se realizó un estudio en Hidalgo donde se determinaron 33 muestras positivas para *E. coli* en vegetales (11 muestras de lechuga, 11 de espinacas y 11 de acelgas) en tiendas de conveniencia y supermercados, de las cuales el 78% mostró resistencia al menos a cuatro antibióticos de los 10 analizados, principalmente a ciprofloxacino un antibiótico de amplio espectro; los autores consideran que *E. coli* resistente podría llegar a los alimentos vegetales a través de aguas residuales o cloacales de origen humano o avícola (Miranda et al., 2010).

Más adelante en 2012, igualmente en el estado de Hidalgo, Cerna-Cortés y colaboradores recolectaron 100 muestras de brotes de alfalfa en mercados minoristas. En el 84% se identificó *E. coli* y el análisis molecular permitió determinarlas como ETEC (2%), EPEC (3%) y STEC (5%), mientras que el resto de las cepas (74%) no mostró la presencia de genes asociados a algún patotipo intestinal. Adicionalmente para las muestras positivas se cuantificó la carga bacteriana, encontrando concentraciones que oscilaron entre 210-240 NMP/g para ETEC, 28-1100 NMP/g para EPEC y 3.6-460 NMP/g para STEC (Cerna-Cortés et al., 2013). En ese mismo año Castro-Rosas y colaboradores analizaron 130 muestras de ensaladas listas para el consumo y detectaron que el 6.2% de las muestras estaban contaminadas con cepas diarrogénicas (DEC), con mayor frecuencia EIEC, ETEC y STEC no O157 (Castro-Rosas et al., 2012).

Nuevamente en Hidalgo, Gomez-Aldapa y colaboradores analizaron 100 muestras de jugo de betabel comercializado en cuatro diferentes mercados. En este caso, el 9% de las muestras albergaron *E. coli* y de estas 4% fue identificado como EPEC, ETEC y STEC no O157 (Castro-Rosas et al., 2012). Un año después en Guadalajara, Torres-Vitela y colaboradores analizaron 280 muestras de jugo de zanahoria. El 100% mostró una calidad sanitaria deficiente al detectar en todas coliformes totales y fecales además de la presencia de *E. coli* identificadas en el 5% de los casos como DEC (Torres-Vitela et

al., 2013). Estos resultados sugieren que el lavado, desinfección y/o la manipulación de estos productos vegetales antes de procesarse, son ineficientes o nulos.

Posteriormente, en 2016 también en Hidalgo, Gomez-Aldapa y colaboradores recolectaron 300 muestras de nopales en mercados públicos, 100 fueron nopales crudos enteros y sin espinas, 100 crudos y procesados en cuadrados pequeños y 100 ensaladas de nopales cocidos. En todas las muestras se determinó la presencia de *E. coli* y mediante PCR se identificaron tres patotipos principalmente: STEC, EPEC y ETEC. Además, todas las cepas de *E. coli* fueron resistentes al menos a 6 antibióticos (amoxicilina con ácido clavulánico, eritromicina, gentamicina, kanamicina, colistina y amikacina) de los 16 que se emplearon para el ensayo (Gómez-Aldapa et al., 2016a). El mismo grupo de trabajo analizó posteriormente 100 muestras de cilantro comercializado en mercados públicos y se identificaron nueve cepas de *E. coli* MDR, de las cuales 3 fueron identificadas como STEC, dos cepas como ETEC y una correspondió al patotipo EPEC. El 100% de las cepas fueron resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico, amikacina, colistina, gentamicina y estreptomina; en el caso del ciprofloxacino fue el 50% y para la tetraciclina el 33% de las cepas (Gómez-Aldapa et al., 2016b).

Finalmente, en la ciudad de Puebla Carreón-León en el 2019, recuperó 12 cepas de *E. coli* a partir de 143 muestras de diferentes vegetales obtenidos de establecimientos fijos y ambulantes de la ciudad de Puebla, siendo lechuga (21%), tomate (17%), cebolla con cilantro (13%), pepino (12%), cebolla (9%), zanahoria (6%), rábano (6%), cilantro (5%), coles de Bruselas (3%), cebolla roja (3%), apio (1%), espinaca (1%), una mezcla de tomate, cebolla y cilantro (1%), calabaza (1%) y pimiento verde (1%). Todas se clasificaron como MDR, diez fueron productoras de BLEE, las dos restantes portaron el gen *bla_{CMY-2}*. También se identificaron genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos (*aac(3)-II* y *aadA*), trimetoprima (*dfrA1/5/14*, *dfrA12* y *dfrA7/17*), sulfonamidas (*sul1* y *sul3*), tetraciclinas (*tetA*) y fenicoles (*catA*). Todas las cepas portaron al menos un plásmido, el replicón más frecuente fue IncF; así como la relaxasa más identificada fue MOB_F y se identificaron una gran cantidad de sistemas de adicción de los plásmidos (3-4 en promedio por cepa) siendo los más comunes *relBE*, *srnBC* y *pemKI* (Carreón-León, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN.

En México el consumo de productos frescos ha ido en incremento, esto debido a que se encuentra asociado con la prevención de enfermedades no trasmisibles. En ese sentido la OMS recomienda que el consumo diario de productos frescos sea al menos 400 g; de hecho, en México de acuerdo con datos de la FAO el consumo *per cápita* de estos productos es de 220 a 350 gramos diarios. Esto aunado a que nuestro país se encuentra entre los diez mayores productores de frutas y vegetales con 38 millones de toneladas anuales y se considera que estas cifras se incrementaran conforme se migre a un estilo de consumo de alimentos más nutritivos.

Sin embargo, los productos frescos, a pesar de sus beneficios, son susceptibles a la contaminación por bacterias patógenas como *E. coli*, especialmente cuando los procesos de cultivo, manipulación, lavado y desinfección son deficientes o nulos, lo que ha generado que se asocien cada vez con mayor frecuencia a ETAs que pueden derivar en brotes alimentarios. Así mismo, la presencia de *E. coli* en la cadena alimentaria no sólo se limita a la mera presencia de cepas patógenas sino también implica un riesgo de transmisión de genes de resistencia a antimicrobianos, lo que agrava aún más el problema. Se ha documentado que este intercambio genético puede ocurrir en el intestino después del consumo de alimentos contaminados; no obstante, también se discute la probabilidad de que esto suceda en la superficie de los alimentos y/o en las superficies inertes durante el procesamiento de los alimentos bajo condiciones favorables para el intercambio de material genético como la formación de biopelícula, aunque este proceso aún se encuentra poco claro.

La importancia de este estudio radica en esclarecer el papel de los alimentos frescos como reservorios de *E. coli* con genes de virulencia y resistencia, y su capacidad para transferir estos determinantes a otras bacterias mediante elementos genéticos móviles (EGM). A través de un análisis bioinformático de genomas de *E. coli* disponibles en bases de datos y un estudio de cepas de *E. coli* recuperadas de vegetales en comercios locales en Puebla, este trabajo contribuye al conocimiento epidemiológico sobre cepas resistentes a antibióticos en ambientes no hospitalarios. Además, ayuda a determinar

cómo estas cepas pueden influir en la propagación de genes de resistencia y virulencia, adoptando un enfoque *One Health*, que integra la salud humana, animal y ambiental.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Identificar los elementos genéticos responsables de la movilización de genes de virulencia y resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos frescos, y evaluar su capacidad para formar biopelículas, adherirse e invadir células humanas. Comparar estos elementos genéticos con los presentes en genomas de *Escherichia coli* de origen alimentario y clínico depositados en bases de datos públicas.

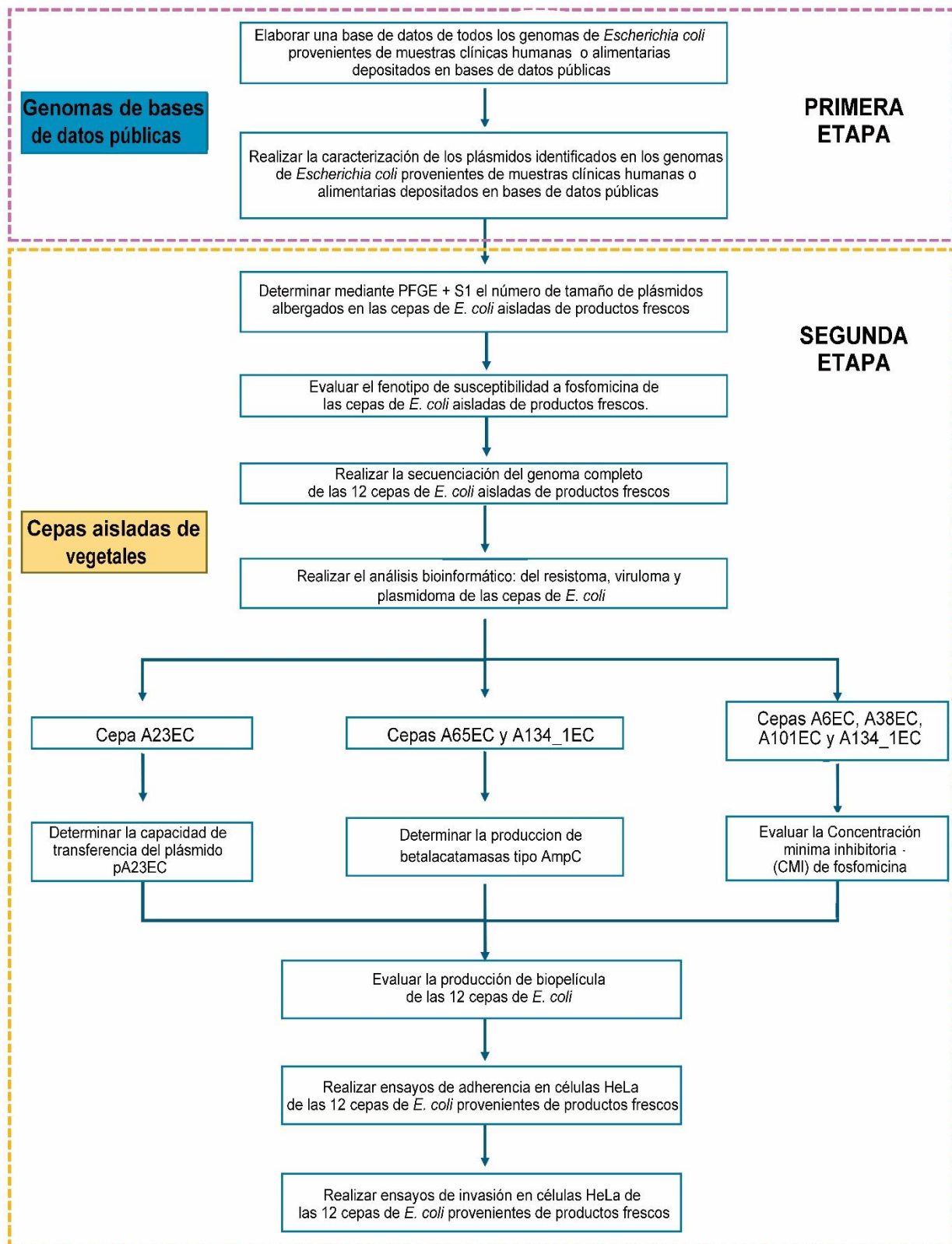
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Elaborar una base de datos de todos los genomas de *Escherichia coli* provenientes de muestras clínicas humanas o alimentarias depositados en bases de datos públicas hasta el 31 de diciembre de 2020.
2. Realizar la caracterización de los plásmidos identificados en los genomas de *Escherichia coli* provenientes de muestras clínicas humanas o alimentarias depositados en bases de datos públicas.
 - 2.1 Establecer el tamaño y número de plásmidos en cada genoma.
 - 2.2 Identificar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos.
 - 2.3 Clasificar los plásmidos de acuerdo con las unidades taxonómicas plasmídicas (PTU).
 - 2.4 Evaluar el potencial de movilización de los plásmidos de acuerdo con la presencia de los elementos de la maquinaria de conjugación: origen de transferencia (*oriT*), relaxasa, sistema de secreción tipo IV y proteína de acoplamiento IV.
 - 2.5 Investigar los genes de virulencia y resistencia a antibióticos en plásmidos conjugativos y no conjugativos.
3. Determinar el número y tamaño de plásmidos de las cepas de *E. coli* aisladas de productos frescos.
4. Realizar la secuenciación y el análisis bioinformático del genoma completo de las 12 cepas de *E. coli* aisladas de productos frescos.
 - 4.1 Identificar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos en cada genoma.

- 4.2 Clasificar los plásmidos de acuerdo con las unidades taxonómicas plasmídicas (PTU).
- 4.3 Evaluar el potencial de movilización de los plásmidos de acuerdo con la presencia de los elementos de la maquinaria de conjugación: origen de transferencia (*oriT*), relaxasa, sistema de secreción tipo IV y proteína de acoplamiento IV.
- 4.4 Investigar los genes de virulencia y resistencia a antibióticos en los plásmidos encontrados.
5. Evaluar el fenotipo de susceptibilidad a fosfomicina de las cepas de *E. coli* aisladas de productos frescos.
6. Determinar la capacidad de transferencia del plásmido de la cepa A23EC, aislada de espinacas.
7. Determinar la producción de betalactamasas tipo AmpC de las cepas A65EC y A134_1EC, aisladas de cilantro listo para el consumo.
8. Evaluar la producción de biopelícula de las 12 cepas de *E. coli* provenientes de productos frescos.
9. Realizar ensayos de adherencia e invasión en células HeLa de las 12 cepas de *E. coli* provenientes de productos frescos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Esquema general de trabajo



6.1 Selección de genomas de *E. coli* de bases de datos públicas.

Se seleccionaron genomas de *E. coli* completamente ensamblados depositados hasta el 31 de diciembre de 2020 en la base de datos GenBank y se verificó la presencia de secuencias quiméricas, contaminadas, duplicadas o mal ensambladas, para eliminarlas del estudio. La base de datos final contiene genomas que pasaron estos controles de calidad. Se excluyeron 93 secuencias porque se definieron como anómalas, que correspondían a secuencias parciales de ADN cromosómico o plasmídico, no disponibles o duplicadas por actualización de su número de ensamblaje o eran secuencias de control interno de plataformas de secuenciación. Se realizó el curado manual con la base de datos del *Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) (Snyder et al., 2007). Además, se colectó la información depositada en cada Bioproject, Biosample o artículos asociados para confirmar el tipo de muestra y la fuente de aislamiento y se seleccionaron aquellas provenientes de alimentos y muestras clínicas humanas. Cada una de las cepas asociadas a los genomas se consideró únicamente de la fuente reportada por los autores. Los archivos descargados de cada genoma fueron fna (ácidos nucleicos fasta), faa (secuencia de proteínas fasta) y gbk (formato *GenBank*); estos archivos se utilizaron dependiendo de lo solicitado en cada herramienta bioinformática. Además, todos los plásmidos se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos NCBI, International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), que incluye DDBJ, EMBL-EBI y GenBank) y RefSeq; prefiriendo los registros RefSeq a los registros INSDC. Se requería que el registro tuviera la etiqueta de ensamblaje "genoma completo". Cuando el registro de plásmido se vinculó a múltiples ID de ensamblaje, solo se asignó a este registro el ensamblaje con la etiqueta "más reciente". La descripción de cada genoma clínico y alimentario se pueden descargar en https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/instance/10896638/bin/NIHMS1964253-supplement-Table_S1A.docx https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/instance/10896638/bin/NIHMS1964253-supplement-Table_S1B.docx

6.2 Cepas de *E. coli* aisladas de vegetales recolectados en la ciudad de Puebla.

Se seleccionaron 12 cepas de *E. coli* multidrogoresistentes, aisladas de diferentes vegetales crudos listos para el consumo, recolectados en la ciudad de Puebla por Carreón-Leon, 2019 en el periodo de noviembre de 2017 a abril de 2018 a partir de establecimientos fijos y ambulantes. Carreón-León, 2019 identificó a estas cepas mediante pruebas bioquímicas (bioMérieux, Francia) siguiendo los esquemas del manual de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias clínicamente importantes de MacFaddin (MacFaddin J.F., 2003). Además, se utilizaron los genes *ybbW* y *uidA* específicos de *E. coli* para confirmar su identidad mediante PCR (Silkie et al., 2008; Walker et al., 2017) y caracterizó parcialmente estas cepas (**Tabla 6.1**). Las cepas se encontraron almacenadas en crioviales con 1 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol al 15% a -70°C e identificadas mediante un número designado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC).

Tabla 6.1 Características de 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales (Carreón-León, 2019).

ID Cepa	Vegetal	Tipo de establecimiento	Filogrupo	BLEE	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CMY}
A6EC	Tomate	Fijo	B1	+	+	-	-	-	-
A7EC	Pepino	Fijo	B1	+	+	-	-	-	-
A23EC	Espinaca	Fijo	B2	+	+	-	+	-	-
A38EC	Tomate	Fijo	A	+	+	+	-	-	-
A44EC	Lechuga	Ambulante	A	+	+	+	-	-	-
A65EC	Cilantro	Ambulante	A	-	-	+	-	-	+
A68EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	Clado 1/2	+	+	-	-	-	-
A101EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	B1	+	+	-	-	-	-
A122EC	Rábanos	Ambulante	A	+	+	+	-	-	-
A134_1EC	Cilantro	Fijo	A	-	-	-	-	-	+
A134_2EC	Cilantro	Fijo	B1	+	+	-	-	-	-
A143EC	Cebolla con cilantro	Ambulante	A	+	+	+	-	-	-

6.3 Extracción de ADN y secuenciación masiva de las 12 cepas de *E. coli*.

El ADN total se extrajo con el Kit de purificación Wizard Genomic ADN Purification, Promega Corporation. Ma, USA siguiendo las indicaciones del proveedor. La concentración del ADN se midió en el NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) y la calidad se evaluó realizando un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.5% con 0.5-1µl de ADN. El ADN de las cepas fue secuenciado mediante Illumina Nextseq, 2x75 pb, con 5 millones de lecturas “paired-end” y con Oxford Nanopore con 100x de profundidad en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT).

6.4 Análisis bioinformático de genomas de *E. coli* de la base de datos y las 12 cepas secuenciadas.

Los genomas provenientes de la base de datos y de las 12 cepas se asignaron a un filogrupa de *E. coli* utilizando ClermonTyping 1.4 (Beghain et al., 2018) (<http://clermontyping.iame-research.center>). Además, los perfiles MLST se predijeron utilizando el esquema MLST de siete genes de Achtman en PubMLST para *E. coli* (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp> (consultado el 26 de febrero de 2021), los serotipos (O:H) se determinaron mediante la herramienta con Serotype Finder 2.0 (Joensen et al., 2015) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), y los patotipos diarragénicos EPEC, ETEC, STEC, EIEC, DAEC, EAEC se asignaron según la presencia de genes marcadores de virulencia específicos para cada patotipo descritos por Robins-Browne et al., 2016 utilizando la herramienta BLASTn (85% de identidad y 60% de longitud mínima, y valor E ≤0.000001) aquellos que contenían marcadores pertenecientes a diversos patotipos se describieron como híbridos y se nombraron de acuerdo con la literatura. Para los genomas contenidos en las bases de datos se incluyó la fuente de aislamiento para la designación del patotipo UPEC, cuando estuvo disponible la descripción del patotipo se describió como la publicación original.

6.4.1 Análisis bioinformático de plásmidos de genomas *E. coli* de la base de datos y 12 genomas de cepas secuenciadas aisladas de productos frescos.

Para identificar los plásmidos en cada secuencia se realizó una revisión manual y mediante la herramienta PlasmidFinder 2.1

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (Carattoli et al., 2014) (85 % de identidad y 60 % de longitud mínima) se identificó el replicón para cada plásmido (Carloni et al., 2017). Además, para los plásmidos asignados al grupo IncF se usó pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>) para determinar los subtipos (Villa et al., 2010). Las Unidades Taxonómicas Plasmídicas (PTU) fueron identificadas por COPLA utilizando los parámetros predeterminados (Redondo-Salvo et al., 2021) (<https://castillo.dicom.unican.es/copla/>).

La presencia de elementos de conjugación en plásmidos se determinó utilizando la herramienta OriTfinder 1.1 (Li et al., 2018) (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/>) con el parámetro de E-value 0.000001 y 90% de identidad. La identidad de las relaxasas se confirmó con MOBScan (Garcillán-Barcia et al., 2020) (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan>) con la configuración predeterminada. Mientras que la clasificación de los plásmidos se estableció según su contenido de MOB y MPF: Conjugativos (presencia de *oriT*, relaxasa, TC4P y TSS4); no movilizables (ausencia de *oriT* o relaxasa) y movilizables (presencia de *oriT* y relaxasa, con TC4P variable) (Smillie et al., 2010) y la búsqueda de sistemas de adición de tipo I (*pndAD*, *srnBC* y *hok-sok*) y tipo II (*ccdAB*, *relEB*, *parDE*, *pemKI* y *vagCD*) se realizó mediante alineamiento BLASTn con los parámetros 90% de cobertura, 80% de identidad y valor E $\leq 0,000001$; el sistema se consideró presente si las secuencias Antitoxina-Toxina (AT) se encontraban adyacentes.

6.4.2 Análisis bioinformático de genes de virulencia y resistencia a antibióticos de los genomas de las bases de datos y los 12 genomas de las cepas secuenciadas.

Todos los genomas se anotaron inicialmente con Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014). Posteriormente, los genes de resistencia a los antimicrobianos se detectaron utilizando ResFinder v4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Bortolaia et al., 2020) (con parámetros 80% de cobertura, 90% de identidad e E-value de 0.0001) y Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v3.2.5 (<https://card.mcmaster.ca/analyze>) (McArthur et al., 2013) por el Identificador de Genes de Resistencia (RGI) con el algoritmo “estricto”. El perfil genético de virulencia se estableció en función de la detección de

genes en VirulenceFinder v2.0 (con identidad del 90% y la cobertura del 70%) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) (Tetzschner et al., 2020), VirulenceFinder database (VFDB) y VFAnalyzer con parámetros predeterminados (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>, consultado el 20 de octubre de 2021) (Liu et al., 2019). Por su parte, el virotipo se asignó según la presencia de genes de virulencia siguiendo los esquemas descritos anteriormente (Barrios-Villa et al., 2018a; Nicolas-Chanoine et al., 2014). Las islas de patogenicidad se predijeron utilizando IslandViewer 4, que utiliza tres métodos independientes para la predicción de islas: IslandPick, IslandPath-DIMOB y SIGI-HMM (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) (Bertelli et al., 2017), la comparación de las islas de patogenicidad se realizó utilizando Blastn v2.13 e Easyfig v2.2.5 (Sullivan et al., 2011) utilizando las secuencias de las cepas prototipo reportadas por Desvaux et al., 2020. También, se realizó un análisis de enriquecimiento con 10,000 *bootstrap* aleatorios para evaluar la prevalencia relativa de los genes (virulencia o resistencia) compartidos en ambas poblaciones. Finalmente, el índice de Jaccard (IJ) se empleó para medir la coocurrencia de dos características binarias (presencia de genes de virulencia y/o resistencia y la asignación del plásmido a Inc/PTU específica), este valor varía de 0 (exclusión mutua) a 1 (coocurrencia total) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$J(m_i m_j) = \frac{1}{|M|} = \sum_{m \in M} \frac{\# \text{plásmidos con } m_a \text{ y } m_b}{\# \text{plásmidos con } m_a \text{ o } m_b}$$

Donde M es el conjunto de plásmidos que pertenecen a un Inc o PTU determinado, m_a es el número de plásmidos que tienen resistencia (JI para resistencia) o virulencia (JI para virulencia) en plásmidos alimentarios y m_b el número que tiene resistencia (JI para resistencia) o virulencia (JI para virulencia) en plásmidos clínicos.

6.4.3 Análisis bioinformático de elementos genéticos móviles de genomas *E. coli* de la base de datos y 12 genomas de las cepas secuenciadas aisladas de productos frescos.

Las secuencias de inserción y los transposones se identificaron con Mobile Element Finder v1.0.3 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) (Johansson et al., 2021) y la identidad de las secuencias de inserción se confirmó utilizando ISfinder. (Siguier et al., 2006); mientras que VRprofile2 (<https://tool2-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile/>) (Wang et al., 2022a) se utilizó para identificar el entorno genético de los genes de resistencia. Así mismo, se utilizó CD-HIT-EST (Li & Godzik, 2006) para agrupar estructuras similares con más del 99% de cobertura y similitud, y se representó una comparación estructural genética múltiple utilizando Easyfig v2.2.5 (Sullivan et al., 2011).

6.4.4 Relación filogenética.

6.4.4.1 Relación filogenética del análisis de los genomas de *E. coli* recolectados de las bases de datos públicas.

Para analizar la relación filogenética, se utilizó CSI Phylogeny 1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>) empleando los genomas de *E. coli* alimentaria y clínica utilizando los parámetros predeterminados con la cepa *E. coli* K-12 (NC_000913.3) como referencia (Kaas et al., 2014). Posteriormente, el dendrograma se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de arranque utilizando Fastree 2.1 (Price et al., 2013). Finalmente, se visualizó utilizando iTOL 6.0 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic & Bork, 2021).

6.4.4.2 Relación filogenética de la cepa A23EC

La cepa A23EC aislada de espinaca fue seleccionada ya que sobresalió por ser una cepa perteneciente al linaje pandémico ST131-B2-O25:H4-H30-Rx. El análisis inicial fue la comparación de A23EC con otros 86 genomas ST131 de *E. coli* completamente ensamblados depositados en *GenBank*, pertenecientes a los clados A, B y C. Los metadatos recopilados fueron la fuente de aislamiento, el año de muestreo y el país de origen (**Anexo S1**). Todos los genomas de *E. coli* denominados “clínicos” (66 genomas)

se asociaron con infecciones humanas de cepas recuperadas de orina (27.2%), sangre (19.6%), esputo (3.0%) y heces (3.0%). La categoría “animal” (4 genomas) representó muestras de perro, gato y cerdo. La categoría “ambiental” (3 genomas) incluye cepas aisladas de aguas residuales. Trece genomas no fueron clasificadas según su tipo de muestra y fueron etiquetados como “sin datos disponibles”. Se usó el Método de grupos de pares no ponderados usando promedios aritméticos (UPGMA) y se realizó con base en SNP, utilizando el gráfico de Newick obtenido con CSI Phylogeny (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny-1.2>, consultado el 27 de junio, 2022) (Kaas et al., 2014) con la cepa EC598 O25b:H4-ST131 de *E. coli* MDR como genoma de referencia (NZ_HG941718.1), caracterizada como productora de la β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15, resistente a fluoroquinolonas y porta la adhesina fimbrial tipo 1 fimH30. (Forde et al., 2014). El árbol filogenético también se visualizó utilizando el software iTOL (<https://itol.embl.de>) (Letunic & Bork, 2021).

6.5 Análisis del tamaño y número de plásmidos de las 12 cepas aisladas de vegetales.

Se realizó la determinación del número y peso molecular de los plásmidos con electroforesis en gel de campos pulsados con nucleasa S1 (PFGE-S1). Esta técnica permite la visualización y determinación de peso molecular de los plásmidos, ya que se utiliza la enzima S1 para linealizar plásmidos. La cepa *E. coli* NCTC 50192 que posee cuatro plásmidos de tamaños conocidos (155.8, 61.3, 40.1 y 6.8 Kb) se empleó como cepa control y se utilizó el programa Gel Quant Express® para calcular el peso molecular de los plásmidos.

6.5.1 Preparación de insertos

A partir de un cultivo puro crecido durante 18 horas en agar infusión cerebro corazón (BHI), se realizó una suspensión en 3 ml de Buffer TE 1X (10mM Tris y 1mM EDTA, con pH 8) hasta conseguir una turbidez de 3 de McFarland en el densitómetro. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (Pulsed Field Certified Agarose, Biorad) al 1.5% en TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 0.1 mM EDTA pH=8,0) y se mezcló con 0.5 ml de la suspensión

bacteriana, para finalmente distribuirse en moldes y generar los insertos que se dejaron resguardados en refrigeración (7°C) hasta su uso.

6.5.2 Lisis bacteriana

En un microtubo se añadió 1 ml de buffer de lisis (Tris 50mM pH=8, EDTA 50mM pH=8, Sarcosil 1%, 0.1 mg/L proteinasa K) y se colocó un inserto para llevarlo a baño maría a 54°C durante 24 horas.

6.5.3. Lavado de insertos

Una vez concluido el tiempo de incubación se retiró del baño maría, se eliminó el buffer de lisis, se recuperó el inserto y se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se realizaron lavados de la siguiente forma:

- a) Se añadieron 7 ml de agua destilada estéril y se incubó durante 10 min en baño maría a 54°C. Se repitió 3 veces.
- b) Se eliminó el agua destilada, se añadieron 7 ml de buffer TE y se incubó durante 10 min en baño maría a 54°C. Se repitió 2 veces.
- c) Por último, se añadieron 7 ml de buffer TE y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

Finalmente, los insertos se colocaron en microtubos y se añadieron 500 µl de TE y se guardaron a 4°C.

6.5.4 Digestión enzimática con nucleasa S1.

Medio (1/2) inserto de cada cepa se digirió con la enzima S1. El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se añadieron 160 U/µl de enzima S1 (Fermentans Thermo Scientific®), 20 µl de Buffer 5X de la enzima y agua estéril. Se incubó por 40 min a 36°C.

Reacción	Volumen	Concentración final
Enzima S1	1.6 µl	0.08 U/mL
Buffer 5X	20 µl	Buffer 1X
Agua	78.4 µl	-
Vol. Final	100 µl	-

Posteriormente la digestión se detuvo colocando 150 µl de EDTA 0.5 M y sarcosil (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) al 1% y se colocó en hielo durante 10 min.

6.5.5 Preparación del gel de agarosa.

Posteriormente los insertos se cargaron en el gel de agarosa (BIORAD®) al 1.2% con 130 ml de TBE 0.5X, el exceso de líquido en el inserto se elimina con papel absorbente. Se colocó la cepa *E. coli* NCTC 50192 en el primer y último pozo. Finalmente, los pozos se sellaron con agarosa a 35-37°C.

6.5.6 Electroforesis.

El corrimiento electroforético se realizó en gel de campos pulsados CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EE. UU.) que se llenó con 2,850 mL de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 µM (0.0162 g). Las condiciones de corrimiento se describen en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2. Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-S1

Gradiente	6 V/cm
Rampa lineal pulsada	1-30 s
Tiempo de corrimiento	22 h
Temperatura	14 °C

6.5.7 Visualización.

Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó en una solución acuosa de bromuro de etidio (20 µl/ 400 ml) durante 5 minutos, posteriormente se destiñó en agua destilada durante una hora y se visualizó en el transiluminador ultravioleta MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems cada hora durante 4 horas.

6.6 Evaluación fenotípica de la susceptibilidad a fosfomicina.

6.6.1 Técnica de difusión en disco.

La sensibilidad de fosfomicina se evaluó mediante la técnica de Kirby-Bauer, en la cual se realizó la estandarización del inóculo bacteriano de *E. coli*, en solución salina estéril (0.85% de NaCl); ajustándose a una turbidez del tubo 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/ml). Posteriormente se inocularon las placas de Müller-Hinton y se emplearon discos que contenían 200 µg de fosfomicina y 50 µg de glucosa-6-fosfato (G6P) recomendado en las guías del Clinical and Laboratory Standards Institute. Se utilizó la cepa ATCC 25922 como cepa control (CLSI, 2022).

6.6.2 Técnica de dilución en agar.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó en agar Müller-Hinton suplementado con glucosa-6-fosfato (Sigma-Aldrich®) y fosfomicina disódica (Sigma-Aldrich®), en seis concentraciones: 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml, 256 µg/ml, 512 µg/ml y 1024 µg/ml. Como cepa control se utilizó la cepa ATCC 25922 (CLSI, 2022).

6.7 Evaluación de la producción de betalactamasas tipo AmpC mediante la prueba tridimensional.

En una placa de Müller-Hinton se inoculó un césped de *E. coli* ATCC 25922, una vez seca la superficie se colocó un disco de cefoxitina de 30 µg en el centro y se dispensaron 20 µl de una suspensión bacteriana al 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/ml) de las cepas A65EC y A134_1EC en una hendidura radial realizada en la placa y se incubaron a 37°C por 18 horas. La prueba se interpretó como evidencia de la presencia de β-lactamasa AmpC cuando se observó un crecimiento de las cepas probadas (A65EC y A134_1EC) en la zona de inhibición.

6.8 Ensayos de conjugación

La cepa A23EC perteneciente al linaje pandémico ST131-B2-O25:H4-H30-Rx que además fue portadora de un plásmido pA23EC^{tetA+}, fue seleccionada. Se emplearon la cepa donadora A23EC y la cepa receptora C600 resistente a rifampicina (Rif^r) se cultivaron por separado en 5 ml de caldo Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Posteriormente, se mezcló 1 mL del cultivo de la cepa receptora y 250 µL de la donante y se inocularon en 20 mL de LB. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y 20°C con agitación de 130 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones en serie de 10 a 10⁶ y se sembraron en placas agar MacConkey (BD Bioxon) suplementado con rifampicina (100 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml) para seleccionar las transconjugantes (Cortés-Cortés et al., 2016). Para confirmar la identidad de los transconjugantes, se realizaron amplificaciones por PCR de los genes *tetA* (ubicación del plásmido) y *bla*_{CTX-M-15} (ubicación cromosómica) (Tabla 6.3). Cada experimento se realizó por triplicado. Mediante el análisis de *t*-student se comparó la frecuencia de conjugación del plásmido en el software estadístico Rstudio 1.4.1103.

La frecuencia de conjugación (**FC**) se describe en este estudio como la relación entre el número de transconjugantes dividido por el número de receptores (Huisman et al., 2022; Mota-Bravo et al., 2023), expresada por la siguiente ecuación:

$$\text{Frecuencia de conjugación} = \frac{\text{Transconjugantes} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right)}{\text{Receptoras} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right)}$$

Tabla 6.3. Secuencias de los iniciadores y condiciones de las PCR, usados para la búsqueda de genes de resistencia

Gen	Iniciadores (5'→3')	Condiciones de reacción	Tamaño del amplificado (pb)	Referencia
<i>bla</i> _{CTX-M 3/15/22}	CTXM3G-F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	94°C 7 min. 1 ciclo 94°C 50 seg. 57°C 40 seg.	1018	Pagani et al., 2003
	CTXM3G-R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	72°C 1 min. 35 ciclos 72°C 5 min. 1 ciclo		
<i>tetA</i>	TETA-1:GTAATTCTGAGCACTGTTCGC	95°C 5 min. 1 ciclo 95°C 30 seg.	937	Sáenz et al., 2004

	TETA-2:CTGCCTGGACAACATTGCTT	62°C 30 seg. 72°C 45 seg. 23 ciclos 72°C 7 min. 1 ciclo		
IncFIA	F:CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	94°C 5 min. 1 ciclo 94°C 60 seg. 60°C 30 seg. 72°C 45 seg.	462	Carattoli et al.,2005
	R:GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
IncFIB	F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC	30 ciclos 72°C 5 min. 1 ciclo	702	
	R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
IncFIC	F: CTAAGAATTTTGATGGCTGGC		270	
	R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC			

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, durante 35-45 min a 100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 100 bp Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los geles se tiñeron en una disolución de bromuro de etidio (Ethidium Bromide 10 mg/ml, Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA,), 0.5 g/L durante 10 segundos y se dejaron desteñir en agua destilada por 40 minutos. Se utilizó un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems para la visualización de las bandas.

6.9 Ensayos de formación de biopelícula.

6.9.1 Formación de biopelícula en placa de 96 pozos.

Las cepas se cultivaron en agar BHI a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se tomaron de 2 a 4 colonias y se colocaron en tubos con solución salina hasta ajustar 0.5 McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml) con ayuda del densitómetro (Grantbio®), a continuación, se realizaron diluciones décuples (diluciones seriadas con factor 10) de la suspensión bacteriana hasta obtener 1×10^4 UFC/ml. Inmediatamente se colocaron por triplicado 20 μ L de suspensión bacteriana en una placa de 96 pozos de poliestireno sin carga y sin tratar. Se le adicionó 180 μ l de caldo BHI a cada uno. La cepa CFT073 se utilizó como control positivo. Se colocó BHI sin inóculo como control negativo y la placa se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se determinó la DO de cada pozo a 530 nm con un lector de microplacas BioTek® y el software KC Junior® de Biotek Systems.

A continuación, se retiró el cultivo de cada pozo, y se lavó con 200 μ l PBS 1x (1.37M, 27 mM, 100 mM y 18 mM) estéril. Después se agregaron 200 μ l de metanol y se incubó a

temperatura ambiente por 10 minutos para posteriormente descartarlo. Se agregaron 150 μ l de cristal violeta al 0.1% y se incubó por 20 minutos nuevamente a temperatura ambiente. El cristal violeta se eliminó y se lavó dos veces con 250 μ l de agua tridestilada estéril. Finalmente se agregaron 200 μ l de ácido acético al 30% por 30 minutos y se leyó a 620nm.

Adicionalmente para cuantificar la concentración de proteínas, se incubó una placa de 96 pozos bajo las mismas condiciones, se recuperó el contenido de cada pocillo en un microtubo, se agregaron 200 μ l de $MgSO_4$ y se colocaron en el mismo tubo. Se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm, se repitió el proceso una vez más. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se le adicionaron 100 de PBS 1x para resuspender el contenido de proteínas. Se cuantificó la concentración de proteínas usando el equipo Qubit (Invitrogen) con el kit Qubit Protein BR Assay kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambas determinaciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones.

6.9.2 Formación de biopelícula en superficie de espinaca.

Se cortaron hojas de espinaca sin defectos visuales (rotura, coloración oscura, superficie convexa o cóncava) en forma circular ($d=15$ mm) y se pesaron, cada disco constituyó una unidad experimental. Los discos se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm) con relación peso volumen (p:v) de solución 1:40 y se agitaron suavemente por 2.5 minutos. Posteriormente se secaron al aire y se colocaron sobre una caja Petri. Se procedió a la inoculación de 20 μ l de una concentración de 1×10^7 UFC/ml de la suspensión bacteriana más 180 μ l de BHI. La totalidad del volumen (200 μ l) se distribuyó en la superficie axial de la hoja, finalmente se incubaron a 20°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación las hojas se lavaron con 200 μ l PBS 1x estéril. Después se agregaron 100 μ l de cristal violeta al 0.1% y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. El colorante se eliminó con lavados de 250 μ l de agua tridestilada, finalmente se agregaron 100 μ l de ácido acético de manera inclinada, se recolectó el lavado y se colocó en un microtubo. Se agregaron nuevamente 100 μ l de ácido acético

sobre la hoja y se dejó incubar por 15 minutos, luego se recolectó el líquido al término de la incubación y se agregó en el microtubo anterior. Finalmente se tomaron 200 μ l de lo recolectado y se colocaron en una placa de 96 pozos para leerse a 620nm.

En ambas determinaciones la significancia estadística se determinó mediante la prueba de Tukey para la comparación de las medias entre todas las cepas de cada condición y la prueba *t-student* para comparar por pares cuando se presentaron dos condiciones (tiempo y temperatura) en el software R studio (v4.3.2.1).

6.10 Ensayos de adherencia bacteriana a células HeLa.

Las células HeLa se sembraron en botellas de cultivo celular con Medio Mínimo Esencial (DMEM) (**Anexo S2**) suplementado con el 5% de suero fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific ®) y se incubaron a 37°C con una tensión de CO₂ del 5%. Una vez alcanzada la confluencia del 80-90% el medio se retiró y se agregaron 4 ml de PBS y se descartó nuevamente. Se agregaron 2 ml de tripsina (0.25%) y se incubó por 2 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 5 ml de DMEM. Una vez que se realizó esto se tomó todo el contenido, se colocó en un tubo Falcon de 50ml y se centrifugó a 500 g a 4°C por 7 minutos, para decantar el sobrenadante. Finalmente se agregaron 4 ml de DMEM y se resuspendieron cuidadosamente las células.

Para determinar la cantidad de células se utilizó la cámara de Neubauer, mezclando 12 μ l de la suspensión celular (1:1) con la solución de azul de tripano, la concentración final se ajustó hasta obtener 5×10^4 células/ml. Se colocaron 425 μ l de esta suspensión por triplicado en una placa Millicel ® EZ slide (Merck Millipore ®) y se incubó a 37°C con una tensión del 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. El medio se retiró y se lavó la monocapa celular con PBS estéril. Posteriormente, se agregaron 250 μ l de una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC (1:20) en medio DMEM y las placas se incubaron por dos horas a 37°C con CO₂ al 5%.

Finalmente se retiró el medio, se lavaron los pozos dos veces con PBS, las células se fijaron agregando 200 μ l metanol por 10 minutos y posteriormente se tiñeron con Giemsa (HYCEL®). El número de bacterias adheridas se contó directamente al microscopio en

14 campos por cada replica; los resultados se expresaron como el promedio de bacterias por célula.

6.11 Ensayos de invasión bacteriana a células HeLa.

Se realizó el mismo protocolo de mantenimiento de las células HeLa utilizado en el ensayo de adherencia hasta alcanzar el 80-90% de confluencia en los pozos de las placas Millicel® EZ slide (Merck Millipore®). De igual forma se agregaron 250 µl de una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC (1:20) en medio DMEM y las placas se incubaron por tres horas a 37°C con CO₂ al 5%.

Transcurrido el tiempo de incubación el medio se decantó y se lavaron los pozos en dos ocasiones con PBS 1x. Posteriormente, se agregaron 250 µl de Tritón X-100 1% durante 10 minutos para liberar las bacterias intracelulares.

A partir del lisado se realizaron diluciones de 10^1 a 10^4 en solución salina isotónica y se sembraron en placas de agar LB que se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente se realizó el conteo de cada placa considerando la dilución correspondiente. Conteos superiores a 100 UFC indicaron replicación. Los ensayos se realizaron por triplicado de manera independiente.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que los resultados muestran inicialmente un análisis bioinformático de genomas de bases de datos públicas; seguido de la segunda etapa del análisis experimental y genómico individual de cepas recolectadas de vegetales comercializados en la ciudad de Puebla; se presentarán los resultados obtenidos, así como su respectiva discusión de forma individual para cada apartado descrito previamente en el diagrama de trabajo.

PRIMERA ETAPA

7.1 Análisis bioinformático de genomas de *E. coli* depositados en las Bases de datos públicos.

7.1.1 Filogenia de genomas de *E. coli*.

Se determinó el origen de cada genoma para seleccionar aquellas provenientes de muestras clínicas y alimentarias. La identificación de los 1794 genomas de *E. coli*, permitió establecer que procedían de seis diferentes fuentes (clínica, veterinaria, ambiental, alimentos, otros, no determinado) (**Figura 7.1**). Las más abundantes fueron las procedentes de muestras clínicas (649) de las cuales el 45% (292/649) se reportaron de heces, orina y sangre; el resto provino de otros fluidos corporales, secreciones respiratorias y provenientes de heridas, expectoraciones, hisopados vaginales, anales y rectales, finalmente las muestras descritas genéricamente como especímenes clínicos humanos. Las cepas obtenidas de fuentes alimentarias, por el contrario, representaron el 4% (77) de los genomas. La mayoría de estas muestras asociadas a alimentos, fueron identificadas como provenientes de carne (ganado, aves y cerdos) o productos lácteos (queso y leche) y estuvieron vinculadas a animales productores de alimentos; en menor proporción algunas muestras provenían de productos frescos (germinados de alfalfa, lechuga, pepino, ensalada mixta y espinaca), cereales (harina) y bebidas fermentadas.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

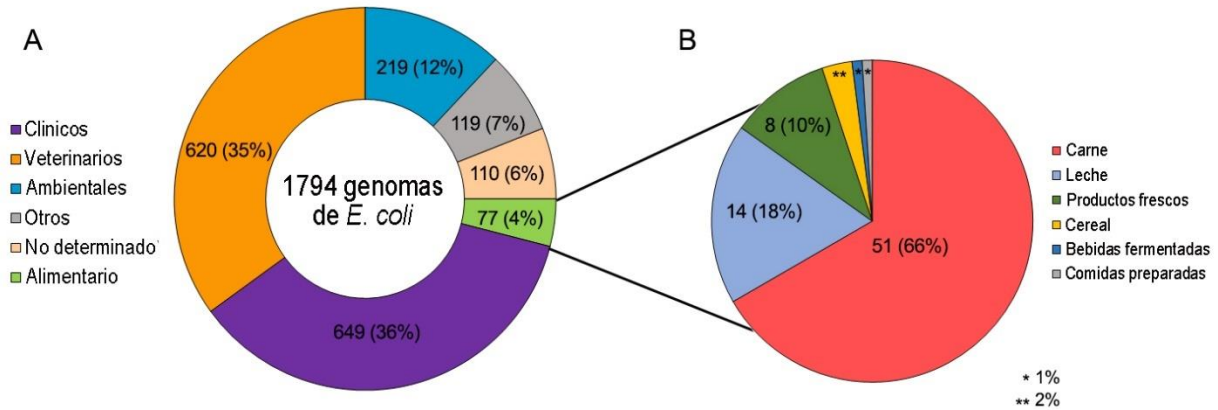


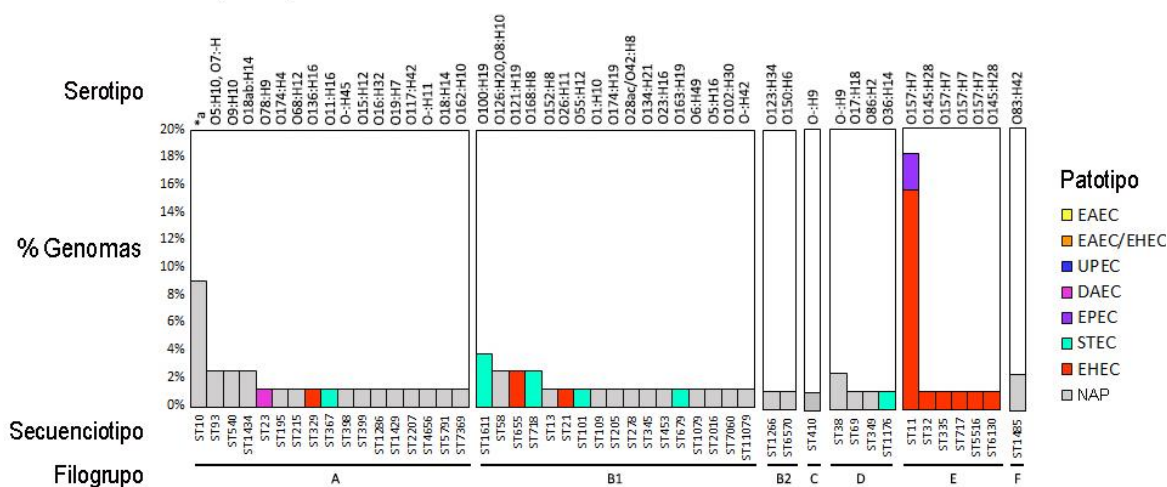
Figura 7.1 A. Fuentes de las secuencias genómicas de *E. coli* recolectadas hasta el 31 de diciembre del 2020 de las bases de datos *GenBank*, ENA y DDBJ center. Las muestras procedentes de ganado vivo se catalogaron como muestras veterinarias. **B.** Tipos de alimentos de los cuales se recolectaron los genomas de *E. coli* de origen alimentario. * indica el número de genomas (1%) provenientes de muestras de comidas preparadas y bebidas fermentadas, ** muestra el porcentaje de genomas de cepas de *E. coli* aisladas de cereales (2%).

Siete filogrupos (A, B1, B2, C, D, E y F) exceptuando G fueron descritos en ambas poblaciones de genomas (clínicos y alimentarios); la abundancia relativa de estos filogrupos fue similar en ambos orígenes (**Figura 7.2**) excepto el filogrupo B2 que fue mucho más abundante en los aislados clínicos (21%), en comparación con los alimentarios (1%).

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

A

Alimentarios (n=77)



B

Clinicos (n=649*)

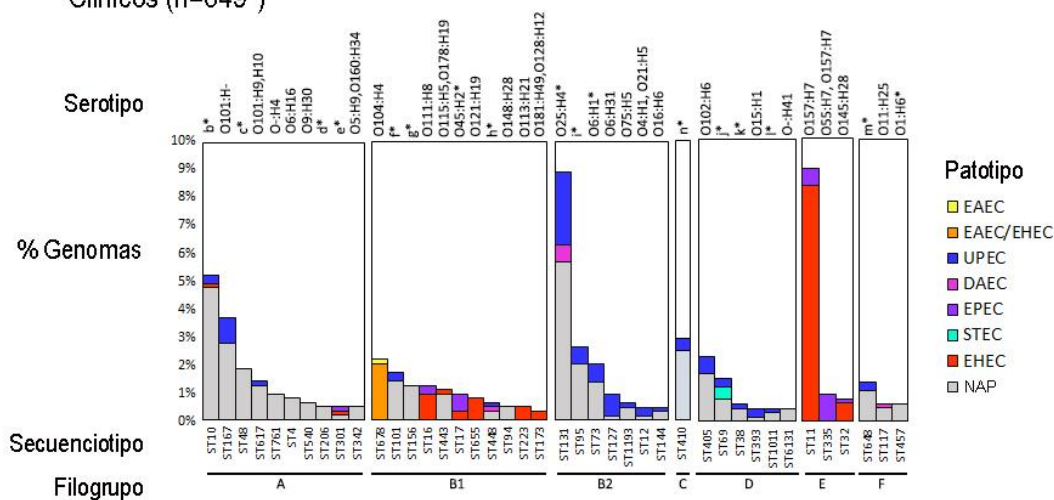


Figura 7.2 Clasificación de filogrupos, serotipos y patotipos. A. Cepas alimentarias. **B** Cepas clínicas.

En **B** solo se muestran ST que cuentan con más de tres genomas (649*). Los asteriscos indican los ST en los que se encuentran más de tres serotipos diferentes. El porcentaje de genomas (% Genomas) muestra el número de genomas correspondiente al filogrupo y ST indicados en la parte inferior; mientras que en la parte superior se indican los serotipos asociados a ese grupo. . a* O10:H32, O159:H4, O26:H2, O81:H27, O113:H4, O16:H48; b* O16:H48, O45:H6, O73:H31, O1:H42, O128O:H12, O101:H10, O101:H4, O101:H17, O45:H45, O8:H17, O10:H32, O89:H10, O29:H4, O157:H16, O49:H12 y O12:H4; c* O88:H6, ? :H37, ? :H20, O6:H16, O113:H16, O78:H11, O145:H11, O24:H4; d* ? :H5, ? :H6 y O141O:H5; e* O180:H2, O80:H2 y O70:H2; f* O188:H31, O131:H31, ? :H31, O86:H21, O39: H21, O154:H21, O131:H31 y O55:H12; g* O35:H28, ? :H25, ? :H28, ? :H9 y O54:H28; h* ? :H37, ? :H8, ? :H32 y O29:H8; i* O1:H7, O18:H7, O45:H7, O2:H7, O25:H4, O1:H7, O50:H4, O50:H4, O18:H7 y O45:H7; j* O17/O44:H18, O15:H18, O25:H18, O15:H18, O17:H18, O153:H2 y O17:H18; k* O153:H9, O102:H6, O51:H30, O153:H18 y ? :H9; l* O86:H51,

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

O124:H45, O124:H46 y O130:H10; m* O51:H4, O1:H6, O154:H51, O1:H6, O102:H6, O1:H42, O45:H6 y O1:H6; n* O8:H9, ? :H9, O8:H21, ? :H21 y O179:H9. Los diferentes patotipos se destacan utilizando el siguiente código de colores: amarillo (EAEC), naranja (EAED/EHEC), azul (UPEC), rosa (DAEC), violeta (EPEC), cian (STEC), rojo (EHEC) y gris (NPA, no asociado a patotipo).

Además, al analizar los secuenciotipos (ST) sólo 16 de los 218 ST presentes en el conjunto de datos combinados, se superpusieron; siendo particularmente el ST11, el más prevalente (23% en alimentos y 11% en la clínica), lo que sugiere que las cepas ST11 pueden exhibir un alto nivel de adaptación en ambos nichos ecológicos y, por lo tanto, cuenta con un elevado potencial de transmisibilidad a través de los alimentos.

Por otra parte, se identificaron cuatro patotipos en genomas alimentarios (EHEC, EPEC, STEC, DAEC) y los mismos más tres adicionales en genomas clínicos (UPEC, EIEC y EAEC). EHEC fue el patotipo más frecuente en ambas poblaciones representado en su mayoría por genomas pertenecientes al ST11 (**Figura 7.2**). Sorpresivamente no se identificaron cepas EAEC o patotipos híbridos EAEC/EHEC en cepas alimentarias.

Así mismo, al establecer la representación de los ST, los genes de virulencia y genes de resistencia mediante un análisis de enriquecimiento por medio de Monte Carlo, se observó que todos ellos superaban el valor de lo que sucedería si esto fuera al azar, es decir, el número de ST, ARG y GV compartidos superaban los esperados ocasionados por el azar (**Anexo S3**).

7.1.2. Caracterización de plásmidos de genomas de *E. coli* alimentarios y clínicos.

Se identificaron 161 plásmidos en genomas de cepas alimentarias (n=77) y 1624 plásmidos en los genomas de cepas clínicas (n=649). Los genomas alimentarios y clínicos tuvieron como un número promedio de plásmidos por cepa 2,0 y 2,5 plásmidos por genoma, respectivamente (**Figura 7.3**).

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

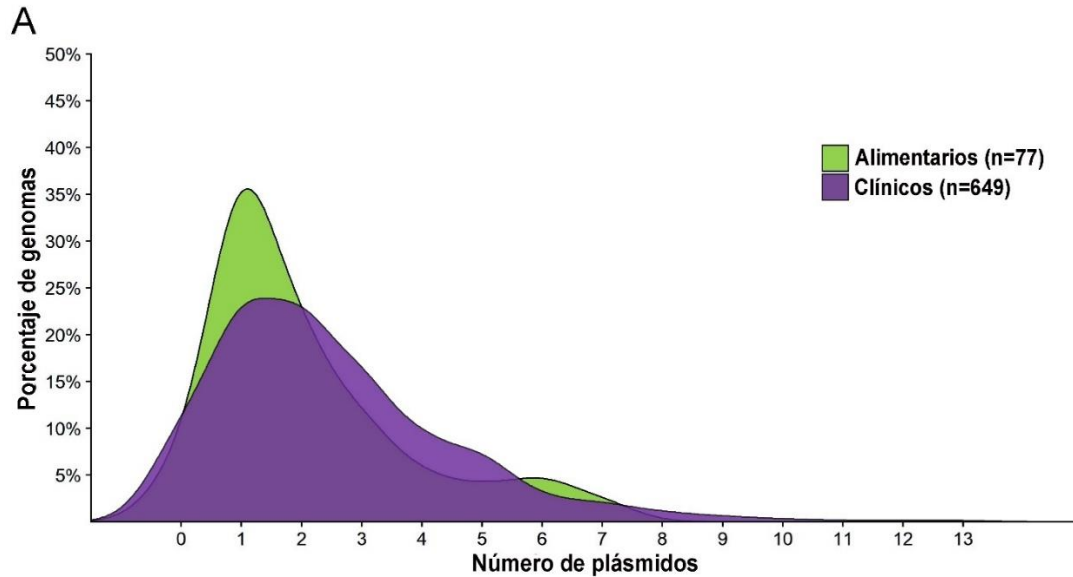


Figura 7.3. Distribución del número de plásmidos. Gráfico lineal que muestra el número de plásmidos por genoma, indicado como % del número total de genomas de cada población.

El rango de tamaños de los plásmidos que presentan ambas poblaciones fue de 1.1 kb – 404 kb. Además, se clasificaron en tres categorías correspondientes a su capacidad de transferencia prevista: conjugativos, movilizables y no movilizables. Para la población de plásmidos alimentarios (161), el 27,3% de los plásmidos se clasificaron como conjugativos y el 9,3% como movilizables, en comparación con el 30,3% y el 6,3%, respectivamente, para los plásmidos clínicos (1624) (**Figura 7.4**); indicando un porcentaje del 63.4% plásmidos no móviles en ambos grupos. Casi todos los plásmidos conjugativos tenían un tamaño superior a 25 kb, mientras que los plásmidos movilizables eran en su mayoría pequeños (<25 kb), lo que sugiere que los plásmidos pequeños se movilizan con la ayuda de plásmidos conjugativos grandes o bien podría ser inherente su diseminación debido al número de plásmidos en cada genoma. En general, en ambos casos el 36.6% que equivale a más de un tercio de los plásmidos tienen el potencial para transferirse horizontalmente.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

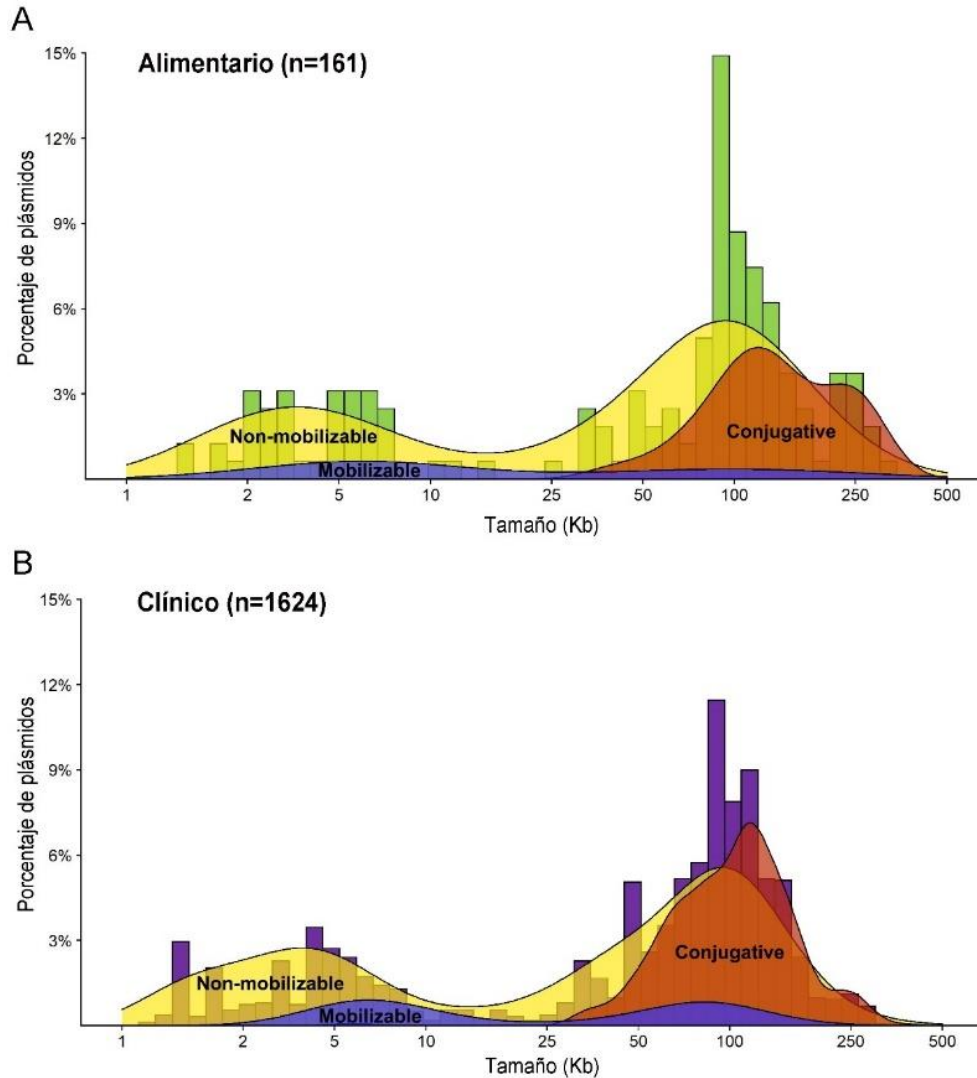


Figura 7.4 Distribución del tamaño del plásmido y perfil de movilización. A. Plásmidos alimentarios (verde). El tamaño del plásmido muestra una distribución trimodal en la gráfica de barras en color verde con los siguientes tamaños de pico medianos: 3.2, 7.3 y 93.2 kb. **B.** Plásmidos clínicos (morado). El tamaño del plásmido muestra una distribución trimodal en la gráfica de barras en color morada con los siguientes tamaños de pico medianos: 1.5, 6.6 y 109.5 kb.

Con PlasmidFinder se identificaron en los plásmidos los grupos de incompatibilidad (Inc) presentes. En plásmidos de *E. coli* aislados de alimentos (161) se identificaron 26 Inc, en comparación con 40 Inc para cepas clínicas (1624). La distribución de frecuencia de 23 Inc de los plásmidos de los dos grupos fueron iguales (**Figura 7.5**). El 31.4% y el 24.8%, respectivamente pertenecieron al IncFIB en ambos orígenes. De manera

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

interesante, un número importante en plásmidos alimentarios y clínicos no pudo ser asociado a ningún Inc y por lo tanto fueron clasificados como No Tipificables.

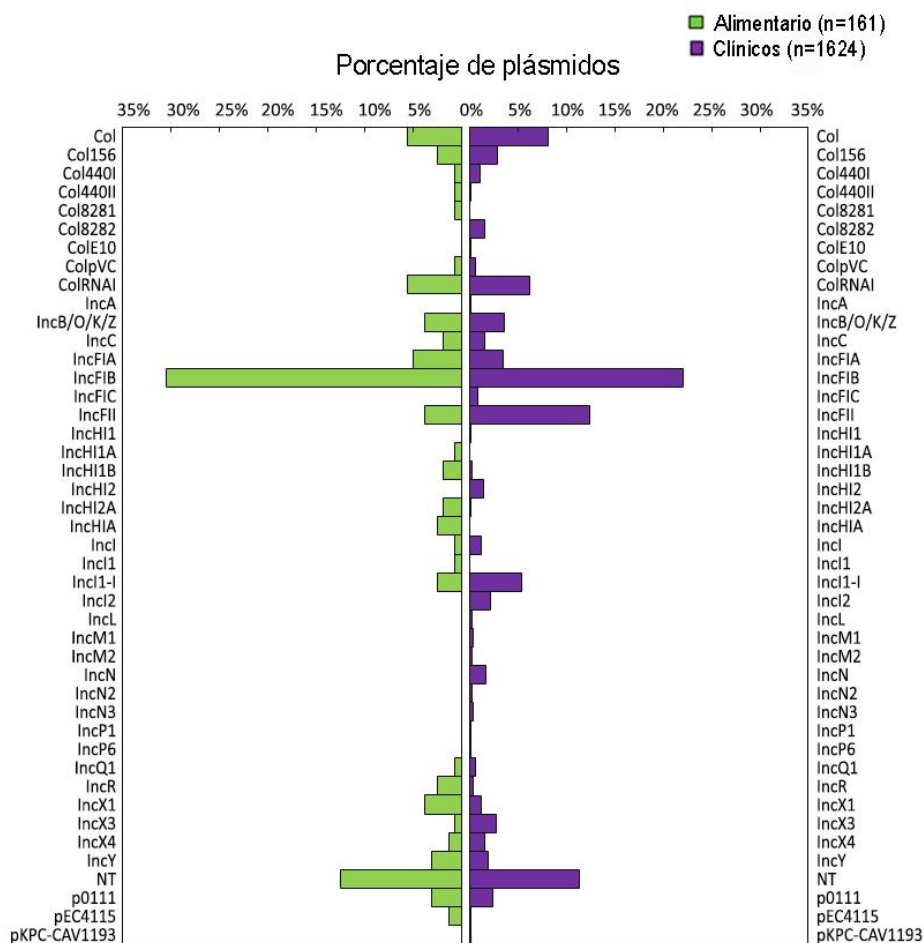


Figura 7.5. Representación de grupos de incompatibilidad en función de la fuente de aislamiento de los plásmidos. Los replicones se enumeran como en PlasmidFinder; cuando el programa no asignó ningún replicón conocido, se definió el plásmido como no tipificable (NT).

Mediante el clasificador taxonómico de plásmidos, COPLA se asignaron las Unidades Taxonómicas Plasmídicas (PTU) basadas en fracciones de alineamiento de identidad de nucleótidos a cada grupo de plásmidos; el análisis asignó 124 de los 161 plásmidos alimentarios a 39 PTU diferentes; en el caso de los plásmidos clínicos, de un total de 1624 plásmidos 1236 fueron asignados a 60 PTU diferentes. Únicamente, tres de las 39 PTU alimentarias (PTU-E46, PTU-E54 y PTU-E79) estaban ausentes en los plásmidos

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

clínicos; esto es notable dada la diferencia de casi 10 veces en el tamaño de los plásmidos clínicos con respecto a los plásmidos alimentarios. Las 24 PTU presentes en plásmidos clínicos y ausentes en plásmidos alimentarios fueron: PTU-58, PTU-9, PTU-E12, PTU-E16, PTU-E19, PTU-E20, PTU-E29, PTU-E38, PTU-E4, PTU-E45, PTU-E47, PTU-E48, PTU-E51, PTU-E65, PTU-E68, PTU-E71, PTU-E73, PTU-E78, PTU-E8, PTU-FK, PTU-FSh, PTU-HI1B, PTU-L/M y PTU-N.

De los 124 plásmidos en genomas alimentarios, mediante COPLA el 63% se predijo su promiscuidad hasta el nivel de familia, el 3.2% hasta el nivel de orden y < 1% hasta el nivel de clase. Por otro lado, se indagó si estas PTU se encontraban en otras especies bacterianas encontrando que las PTU identificadas habían sido reportadas previamente en otros géneros bacterianos, siendo *Salmonella* y *Klebsiella* los mayormente representados, 13 y 10 PTU, respectivamente (Redondo-Salvo et al., 2020) (**Figura 7.6, panel B**).

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

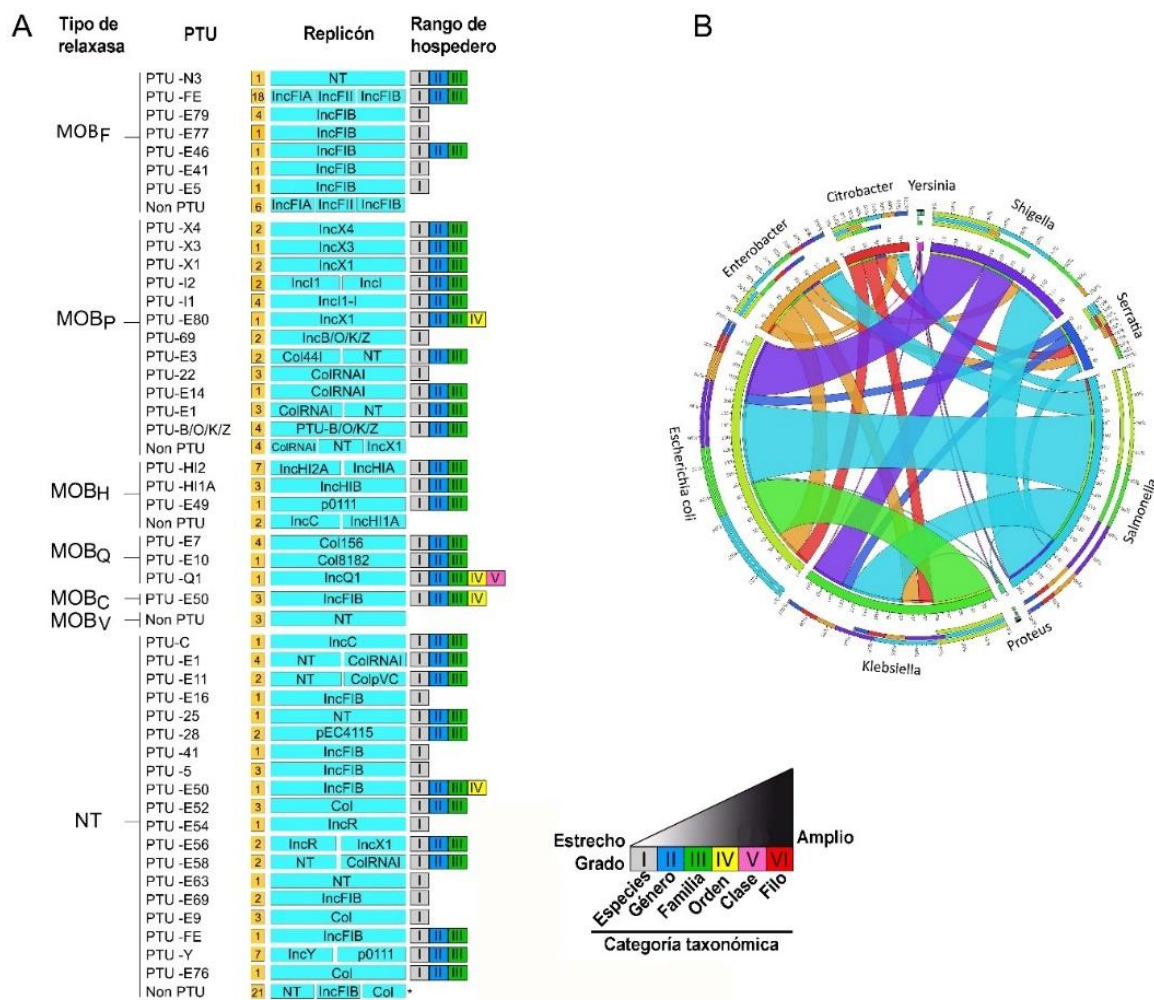


Figura 7.6 Clasificación PTU de plásmidos alimentarios. A. Clasificación de PTU y su correspondencia con las familias de relaxasas (MOB). El número de plásmidos atribuidos a cada una de las PTU se enumera a la derecha, dentro del cuadrado naranja. Inmediatamente se indica el Inc y el rango de hospedero con números romanos. **B. Diagrama de cuerdas que muestran la presencia de estas PTU en distintos géneros bacterianos.** Los géneros que comparten una PTU determinada se muestran unidos por un borde curvo, cuyo grosor es proporcional al número de plásmidos compartidos. Los géneros bacterianos fueron *Salmonella* (13), *Klebsiella* (10), *Shigella* (9), *Enterobacter* (6), *Citrobacter* (6), *Serratia* (2), *Yersinia* (1) y *Proteus* (1).

7.1.3 Contenido de genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) en plásmidos

Se encontraron 175 genes asociados a la resistencia de al menos 14 familias diferentes de antibióticos (Tabla 7.1). Las familias estuvieron representadas de manera similar en ambas poblaciones de plásmidos, con genes que codifican para β -lactamasas, y resistencia hacia aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetoprim con mayor frecuencia.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

Los genes asociados a la resistencia a fosfomicina únicamente se encontraron en plásmidos de origen clínico.

Tabla 7.1 Contenido de ARG, agrupados por familias y superposición entre conjuntos de datos de plásmidos alimentarios y clínicos.

Familia de antibióticos	Genes de resistencia asociados	
	Alimentos	Clinica
Aminoglucósidos (17,33,12*)	<i>acc(3)-IIa, aph(3'')-Ib, aadA1, aadA2, aph(6)-Id, aac(3)-IId, aph(3')-Ia, aadA22, aadA5, aph(3')-IIa, aac(3)-IIg, aac(3)-IV, aac(6')-IIc, aadA17, aadA24, aph(4)-Ia, aph(6)-Ic</i>	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aadA5, aadA1, aadA2, aac(3)-IId, aph(3')-Ia, aac(3)-Ile, rmtB, aac(6')-Ib10, aac(3)-IV, aadA16, aph(3')-IIa, ant(3'')-IIa, aph(4)-Ia, rmtC, aadA22, aac(6')-Ib9, aadA3, aac(3)-IIc, aac(3)-VIa, ant(2'')-Ia, aph(6)-Ic, aac(6')-II, aph(3')-VI, aph(3')-VIa, aph15, armA, aac(6')-33, aac(6')-Ilan, aac(6')-Ib aadA6, aph(3')-IIIa, aph(3')-VIb</i>
betalactamasas (14,58,11**)	<i>blaTEM-1b, blaCTX-M-15, blaCTX-M-55, blaTEM-1a, blaCMY-2, blaSHV-12, blaCTX-M-65, blaHERA-3, blaLAP-2, blaNDM-5, blaOXA-10, blaTEM-135, blaTEM-214, blaTEM-215</i>	<i>blaTEM-1b, blaCTX-M-15, blaTEM-1a, blaCTX-M-55, blaNDM-5, blaCTX-M-14, blaCTX-M-1, blaOXA-1, blaKPC-2, blaCMY-2, blaCMY-42, blaCTX-M-27, blaKPC-3, blaCMY-6, blaOXA-181, blaOXA-9, SHV-134, blaTEM-135, blaCARB-3, blaCTX-M-3, blaOXA-48, blaCMY-4, blaCTX-M-65, blaNDM-4, blaTEM-57, blaVIM-1, blaCMY-136, blaCTX-M-64, blaNDM-7, blaOXA-10, blaSHV-1, blaTEM-214, blaTEM-30, blaCMY-111, blaCTX-M-2, blaCTX-M-125, blaCTX-M-44, blaIMP-14, blaIMP-4, blaKPC-4, blaNDM-6, blaNDM-9, blaOXA-163, blaOXA-204, blaOXA-4, blaOXA-484, blaPBP3, blaSCO-1, blaTEM-10, blaTEM-156, blaTEM-169, blaTEM-190, blaTEM-20, blaTEM-201, blaTEM-215, blaTEM-26, blaVEB-5</i>
fluoroquinolonas (6,6,4)	<i>qnrS1, qnrB19, qnrA1, qnrB1, aac(6')-Ib-cr, qnrS11</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrS1, oqxA, oqxB, aac(6')-Ib-cr6, qepA4, qnrA1, qepA2, qnrB1, qnrB10, qnrB2, qnrB4, qnrB6, qnrE2, qnrS2</i>
trimetoprim (5,14,5)	<i>dfrA12, dfrA14, dfrA1, dfrA17, dfrA5</i>	<i>dfrA17, dfrA12, dfrA14, dfrA27, dfrA1, dfrA5, dfrA16, dfrA7, dfrA7, dfrA8, dfrA21, dfrA25, dfrB4</i>
fenicoles (3,9,3)	<i>floR, cmlA1, cmlA5</i>	<i>cmlA1, catI, floR, catB3, catII, cmlA5, catB2, cmlA6, catIII</i>
tetraciclinas (4,8,4)	<i>tet(A), tet(M), tet(B), tet(X4)</i>	<i>tet(A), tet(B), tetR, tet(X4), tet(D), tet(C), tet(W/N/W), tet(M)</i>
macrolidos (1,5,1)	<i>mphA</i>	<i>mphA, mef(B), mphB, mphE, EreA2</i>
colistina (2,3,1)	<i>mcr-1.1, mcr-9.1</i>	<i>mcr-1.1, ICR-Mo, mcr-1.2</i>
sulfonamidas (3,3,3)	<i>sul1, sul2, sul3</i>	<i>sul1, sul2, sul3</i>
lincosamida (3,3,3)	<i>linG, lnu(F), lnu(G)</i>	<i>linG, lnu(F), lnu(G)</i>

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

rifamicyna (1,2,1)	<i>arr-2</i>	<i>arr-2, arr-3</i>
glycopeptidos (1,1,1)	<i>blmA</i>	<i>blmA</i>
nucleosidos (1,1,1)	<i>sat-2</i>	<i>sat-2</i>
fosfomicina (0,3,0)	-	<i>fosA2, fosA3, fosA4</i>
rRNA methylasas (1,2,1)	<i>ermB</i>	<i>ermB, msrE</i>

Genes contenidos en plásmidos alimentarios, en plásmidos clínicos, genes compartidos entre plásmidos alimentarios y clínicos. Los genes están coloreados según su presencia sólo en alimentos o clínica o compartida: negro para genes no compartidos y negrita para genes exclusivos de plásmidos alimentarios y rojo para genes compartidos en ambos nichos. Los números colocados entre paréntesis en la columna de “familia de antibióticos” indica (Número de genes en plásmidos alimentarios, número de genes en plásmidos clínicos y número de genes compartidos). Los asteriscos indican para los aminoglucósidos y los betalactámicos que el solapamiento supera el número esperado de solapamientos al azar, *5 y **6 genes, respectivamente.

El número promedio de ARG por plásmido fue mayor en los plásmidos clínicos que en los alimentarios, esto se debió en gran medida porque existió un número mayor de plásmidos con presencia de ARG en genomas de origen clínico (53.8%) en comparación con los genomas provenientes de alimentos (34.1%) (**Figura 7.7**). De los 175 ARG identificados, solo 51 genes se superpusieron entre las dos poblaciones de plásmidos. Once genes ARG fueron exclusivos de los plásmidos alimentarios (**Tabla 7.1**) y 113 eran exclusivos de plásmidos clínicos.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

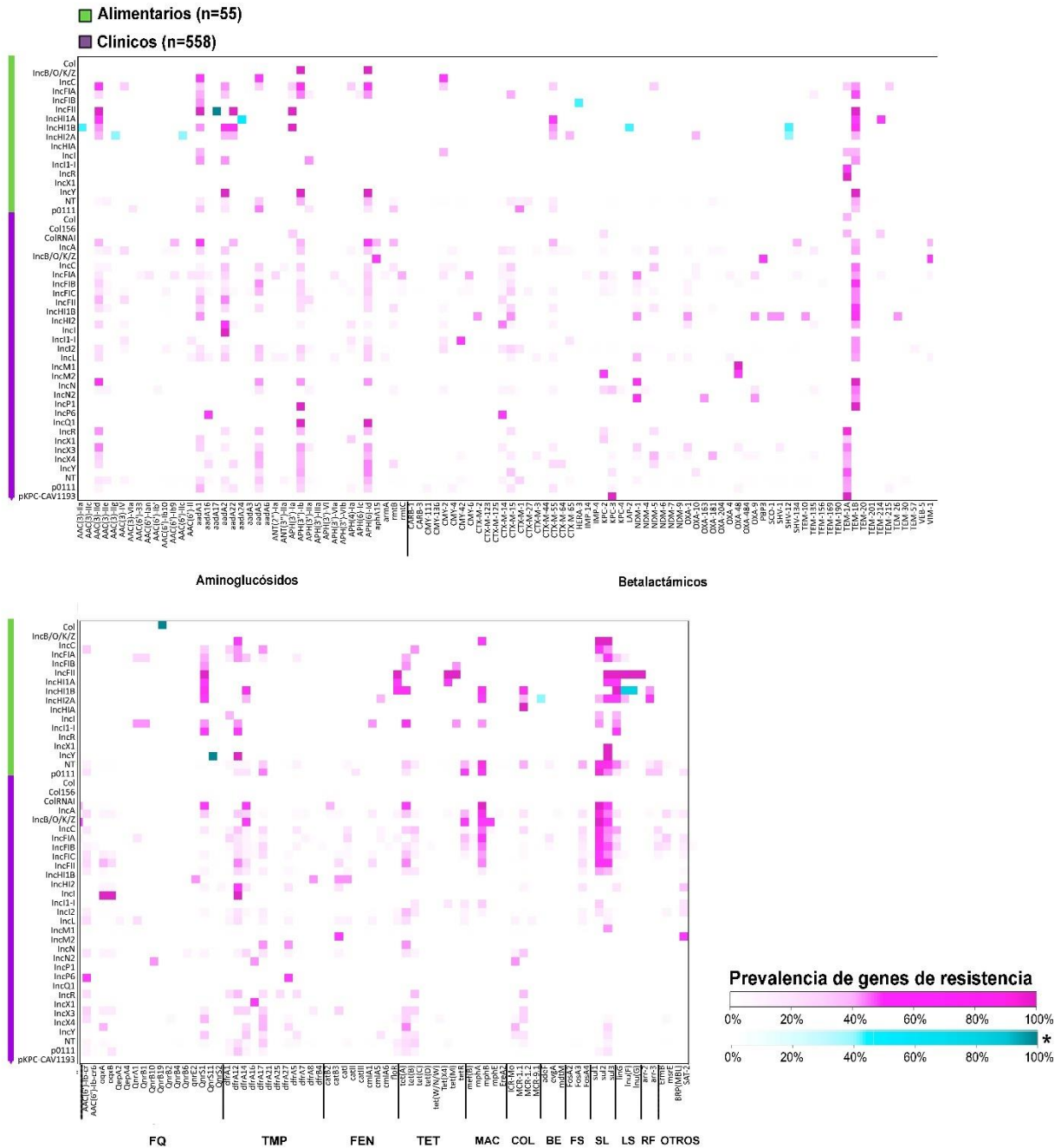


Figura 7.7. Distribución de genes ARG en plásmidos, desglosada por clase de antibiótico, considerando el grupo de incompatibilidad (Inc). La intensidad del color es proporcional a la prevalencia de la asociación tipo gen-Inc. Plásmidos alimentarios (n=55) y plásmidos clínicos (n=558) que albergaron al menos un gen de resistencia. FQ, fluoroquinolonas; TMP, trimetoprim; FEN, fenicoles; TET, tetraciclina; MAC, macrólidos; COL, colistina; BE, bombas de eflujo; FS, fosfomicina, SL, sulfonamidas, LS, lincosamidas, RF, rifampicina.

Uno de los hallazgos más sobresalientes fue el reporte del gen *bla*_{NDM-5} en un plásmido IncFII (subtipo F1:A - :B -) (pF070, AP023237.1) aislado de una muestra de carne de

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

cerdo. La **Figura 7.8** compara el entorno genético de los 26 plásmidos (alimenticios y clínicos) que transportan *bla*_{NDM-5}. Esto incluye seis plásmidos IncX3 de origen clínico y una variedad de subtipos IncF asociados con el mismo PTU (PTU-FE). En términos de su entorno genético, todos los plásmidos portadores de *bla*_{NDM-5} los podemos clasificar en cuatro grupos diferentes (a, b, c y d) según el análisis de las estructuras genéticas; en la figura resalta la presencia de IS específicas en la vecindad, pero también la presencia o ausencia de los siguientes genes: *ble*_{MBL} (gen de resistencia a la bleomicina), *trpF* (fosforibosiltranilato isomerasa), *dsbD* (proteína de intercambio de disulfuro) y de proteínas hipotéticas de diferentes longitudes.

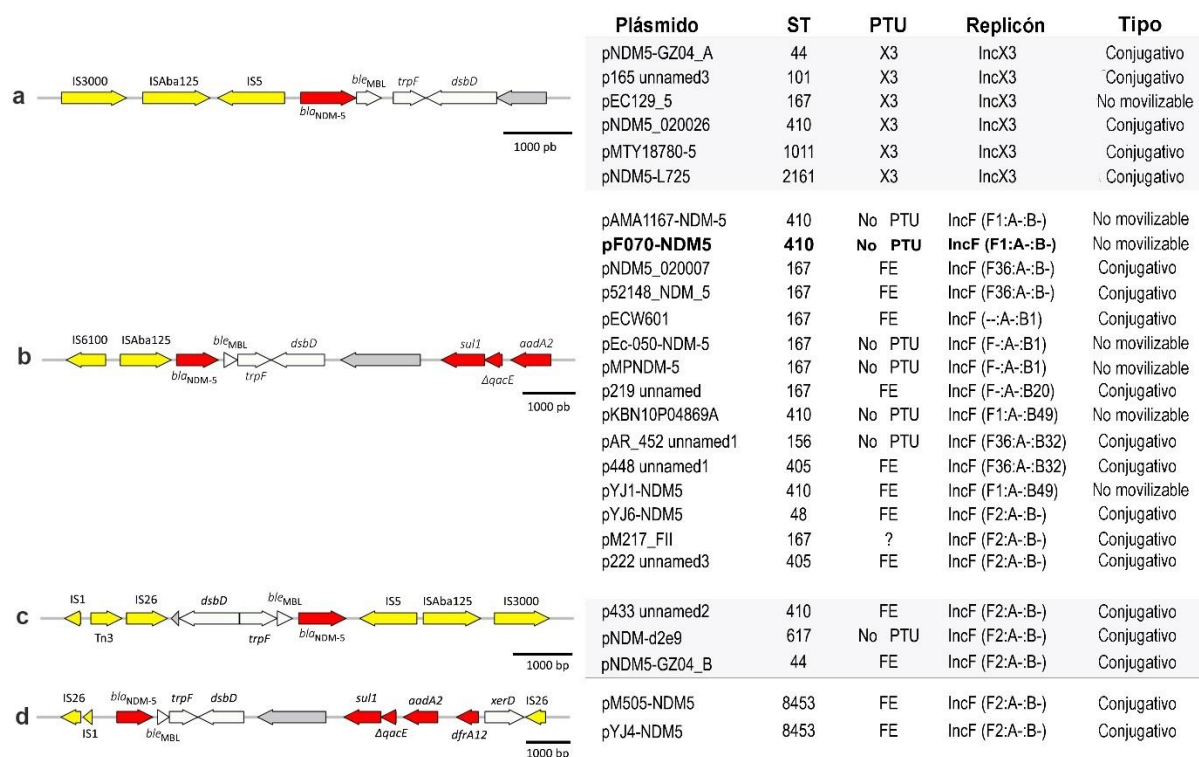


Figura 7.8. Contexto genético del gen *bla*_{NDM-5} plásmidico. Se muestran los genes, transposasas y secuencias de inserción que rodean al gen *bla*_{NDM-5}. El tamaño de la flecha es proporcional a la longitud prevista de los genes identificados. El color significa: amarillo, genes transposasa y secuencias de inserción; rojo, genes de resistencia a antibióticos; blanco, otros; gris, proteínas hipotéticas. Los plásmidos se clasificaron en cuatro grupos (a-d) con base en el contexto genético del gen *bla*_{NDM-5}. Las etiquetas para PTU: "?", "PTU putativa" o "No PTU" se mantuvieron de acuerdo con COPLA ya que representan una asignación verdadera, esto indica que la base de datos de COPLA no contaba en el momento del análisis con al menos 3 plásmidos pertenecientes al mismo grupo del plásmido analizado. El único plásmido de origen alimentario se resalta en negrita.

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

Así mismo, en este estudio se reporta en plásmidos alimentarios portadores de genes de resistencia a la colistina: *mcr-1.1* y *mcr-9.1* transportados mayormente en plásmidos IncHIA (79%) e IncI (solo *mcr-1.1*) comparándolos con plásmidos clínicos (**Figura 7.9**). Se establecieron 6 entornos genéticos de acuerdo con la presencia de secuencias de inserción: a) IS*ApI1*-*mcr*, b) IS*Kpn26*-*mcr*, c) IS*903*-*mcr*, d) *mcr* flanqueado por proteínas hipotéticas, e) IS*ApI1*-*mcr*-DUF156-IS*ApI1*, f) IS*ApI1*-DUF186-IS*Kpn26*-IS*ApI1*

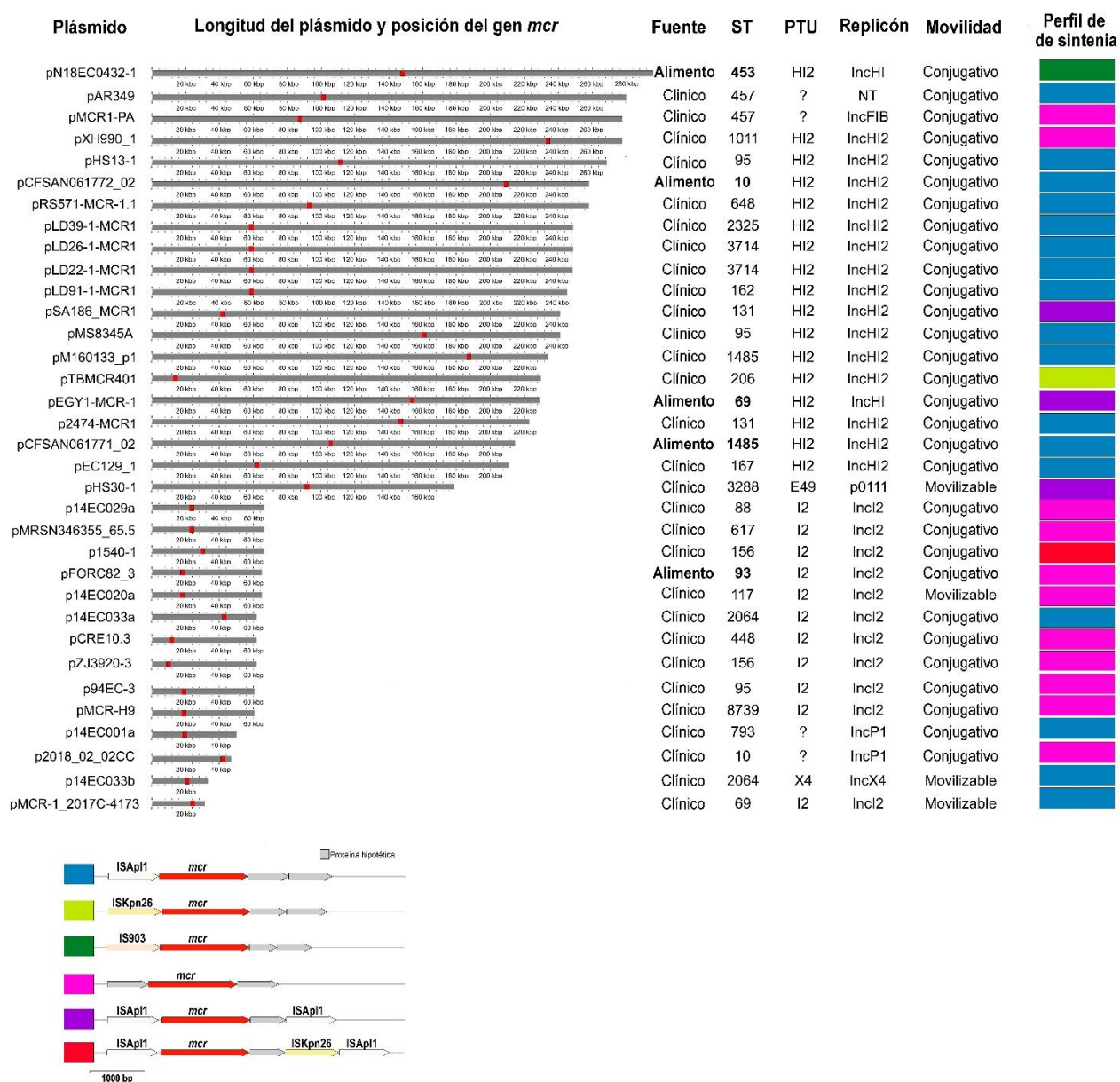


Figura 7.9 Contexto genético del gen *mcr*, comparando plásmidos alimentarios y clínicos. Se muestra un esquema de los plásmidos que contienen el gen *mcr* (5 alimentarios y 29 clínicos), ordenados

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

por tamaño descendente. La localización del gen *mcr* se muestra con un rombo rojo. En la parte inferior se muestra la sinténia del gen *mcr* pueden clasificarse en seis perfiles definidos (azul, amarillo, verde, rosa, morado y rojo), en la figura se muestra un representante de cada una de estas categorías establecidas de acuerdo con la presencia e identidad de secuencias de inserción que flanquean al gen *mcr*. Las flechas blancas, amarillas y rosa claro denotan las secuencias de inserción IS*Ap1*, IS*Kpn26* e IS*903*. Las flechas rojas denotan el gen de resistencia a la colistina *mcr*. Las flechas sin etiqueta y de color gris representan proteínas hipotéticas (de tamaño variable).

7.1.4 Contenido de genes de virulencia en plásmidos

Se identificaron 72 genes de virulencia conocidos en el conjunto completo de datos de plásmidos. El número promedio de genes de virulencia por plásmido fue mayor en plásmidos clínicos (4 factores de virulencia en promedio, en comparación con 3 para plásmidos alimentarios), pero la distribución general del número de genes de virulencia/plásmido fue similar (sin diferencia estadística, $p > 0.5$). Únicamente 33 genes se compartieron entre los dos grupos de plásmidos (**Anexo S4**) y solo cinco de ellos fueron exclusivos de los plásmidos alimentarios: *afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaE8* y *fim41a*, los primeros cuatro codifican para adhesinas afimbriables, mientras que el quinto codifica la subunidad de la fimbria F41 asociada a patotipo ETEC (Duan *et al.*, 2020b).

Por otra parte, los genes de virulencia más frecuentes compartidos entre las dos poblaciones son *traT*, *sitA*, *iucC*, *ompT* y *hlyF*. Se ha informado que *sitA* y *iucC* desempeñan un papel en el secuestro del hierro y la regulación del metabolismo en cepas ExPEC (Sarowska *et al.*, 2019). El gen *ompT* codifica una endopeptidasa de membrana integral bien caracterizada que se describe como participante en la adhesión a las células epiteliales del hospedero en las cepas ExPEC, APEC y DAEC (Kukkonen & Korhonen, 2004; Torres *et al.*, 2020; Wolfgang *et al.*, 2017); *hlyF* es una hemolisina que contribuye a la virulencia de ExPEC al regular la liberación de toxinas durante el establecimiento de la infección (Gigliucci *et al.*, 2019; Murase *et al.*, 2016). Finalmente, *traT* es un gen que codifica una lipoproteína de membrana externa cuya expresión se ha relacionado con una mayor resistencia sérica, aunque el mecanismo no se ha descrito claramente y también se ha demostrado su participación en la modulación del proceso de conjugación (Sukupolvi & O'Connor, 1990; Li *et al.*, 2022) (**Figura 7.10**).

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

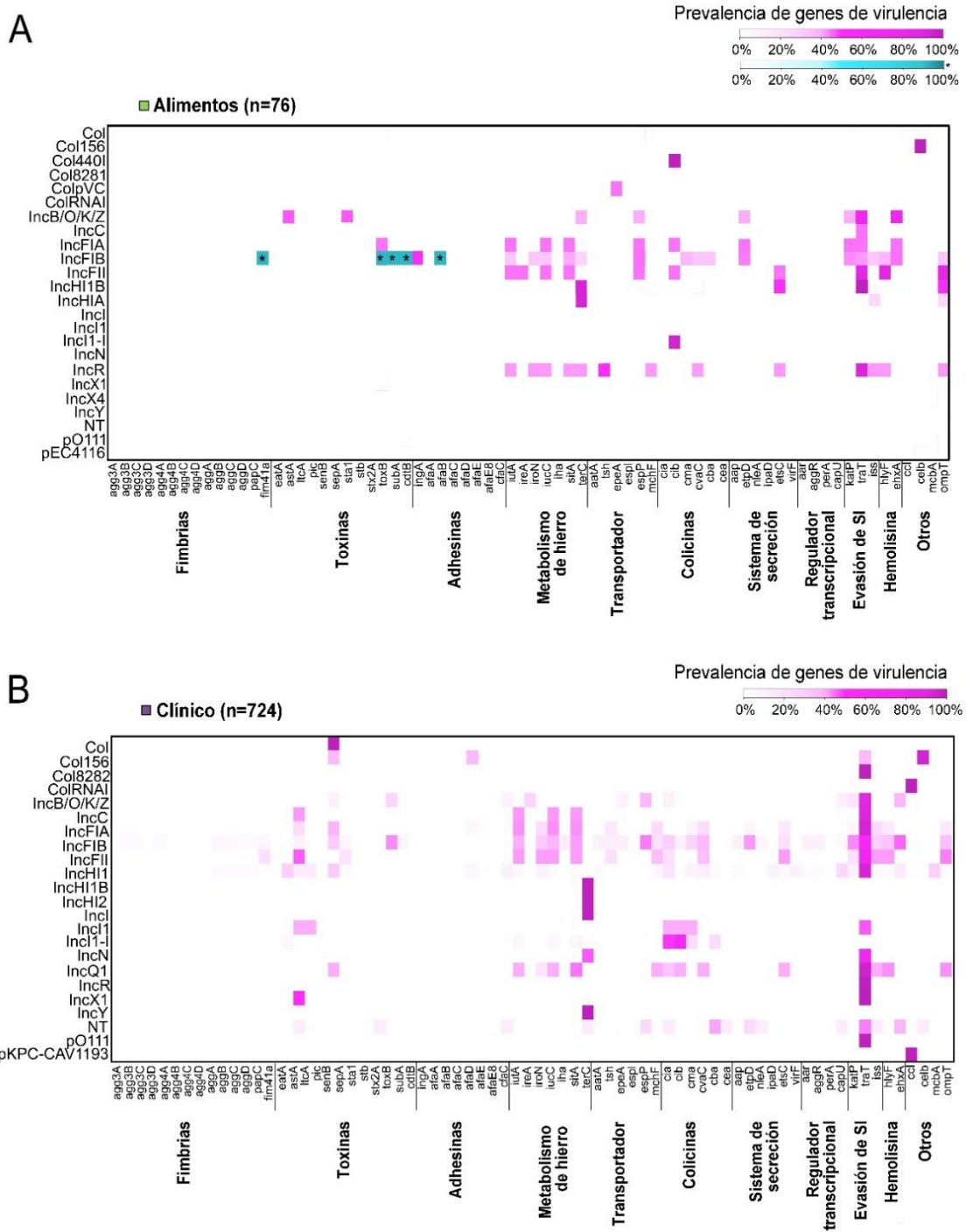


Figura 7.10 Presencia de genes de virulencia en plásmidos pertenecientes a cada tipo de incompatibilidad (Inc). A. Plásmidos alimentarios. B. Plásmidos clínicos. La intensidad del color rosa es proporcional a la prevalencia de la asociación gen-tipo Inc. A. Plásmidos alimentarios (n=76). B. Plásmidos clínicos (n=724).

7.1.5 Coocurrencia de ARG y genes de virulencia con plásmidos (Inc/PTU).

El índice de Jaccard (JI) mide la coocurrencia de dos características binarias y varía de 0 (exclusión mutua) a 1 (coocurrencia total), valores de Jaccard de 0.3-0.5 generalmente nos indica que las características suceden ambas de manera frecuente, mientras que valores superiores a 0.5 indicarían que hay una coocurrencia alta, es decir, más de la mitad de los elementos (genes de virulencia o resistencia) se encuentran en el otro conjunto de datos (Inc y PTU). En este caso, se empleó con la finalidad de cuantificar la ocurrencia de que un plásmido perteneciente a un grupo de incompatibilidad o PTU definido, y la presencia de genes de virulencia o resistencia a antimicrobianos.

Los resultados de los valores de Índice de Jaccard (JI) mostrados en la **Tabla 7.2** varían entre 0 y 0.29, con un promedio de 0.11. Los valores más altos correspondieron para genes de resistencia a los antimicrobianos a IncR, IncF (F-:A -:B1) y p0111 (IJ=0.18), IncX1 (IJ=0.18) e IncI1-1 (IJ=0.14). Por otra parte cuando analizamos para los genes de virulencia se observa que los más representativos fueron IncF(F23:A-:B3) (IJ = 0.45), IncB/O/K/Z (IJ=0.33) y IncHIB (IJ=0.25) (**Tabla 7.2 primeras 4 columnas**). Estos valores sugieren moderadamente que hay una predilección de grupos específicos de Inc para albergar genes de resistencia, de virulencia o de ambos, como en el caso de IncF. Además, Es de notar que, en comparación con los ARG, los factores de virulencia producen valores de JI mucho más altos; esto se debe, al menos en parte, al número menor de genes de virulencia involucrados (72 genes de virulencia, en comparación con 175 genes de resistencia).

Tabla 7.2 Representación del Índice de Jaccard (IJ) para cada categoría (resistencia y virulencia) en plásmidos representados por al menos tres unidades en genomas alimentarios y clínicos.

Inc Group	IJ resistencia	IJ virulencia	IJ total	Grupo PTU	IJ resistencia	IJ virulencia	IJ total
Col	0	0	0	Non-PTU	0.07	0	0.05
Col156	0	0.2	0.2	Non-PTU	0	0.03	0.02
ColRNAI	0	0	0	Non-PTU	0	0.33	0.25
IncB/O/K/Z	0.09	0.33	0.21	PTU-?	0	0	0
IncC	0.1	0.11	0.1	PTU-B/O/K/Z	0.09	0.36	0.22
IncF (F-:A-:B-)	0.02	0.11	0.06	PTU-E22	0	0	0

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

IncF (F-:A-:B1)	0.18	0.4	0.25	PTU-E5	0	0.45	0.31
IncF (F2:A-:B-)	0.02	0.06	0.02	PTU-E50	0.38	0	0.38
IncF (F23:A-:B3)	0	0.45	0.29	PTU-E69	0	0.44	0.44
IncHI1B	0.03	0.25	0.05	PTU-E7	0	0.2	0.2
Incl1-I	0.14	0.11	0.13	PTU-E9	0	0	0
IncR	0.18	0.08	0.15	PTU-FE	0.23	0.41	0.28
IncX1	0.17	0	0.15	PTU-HI1A	0.12	0.25	0.14
IncY	0.03	0	0.03	PTU-HI2	0.24	0.5	0.25
NT	0.03	0	0.02	PTU-I1	0.11	0.13	0.11
p0111	0.18	0	0.18	PTU-Y	0	0	0
Promedio	0.07	0.13	0.12	Promedio	0.07	0.17	0.15

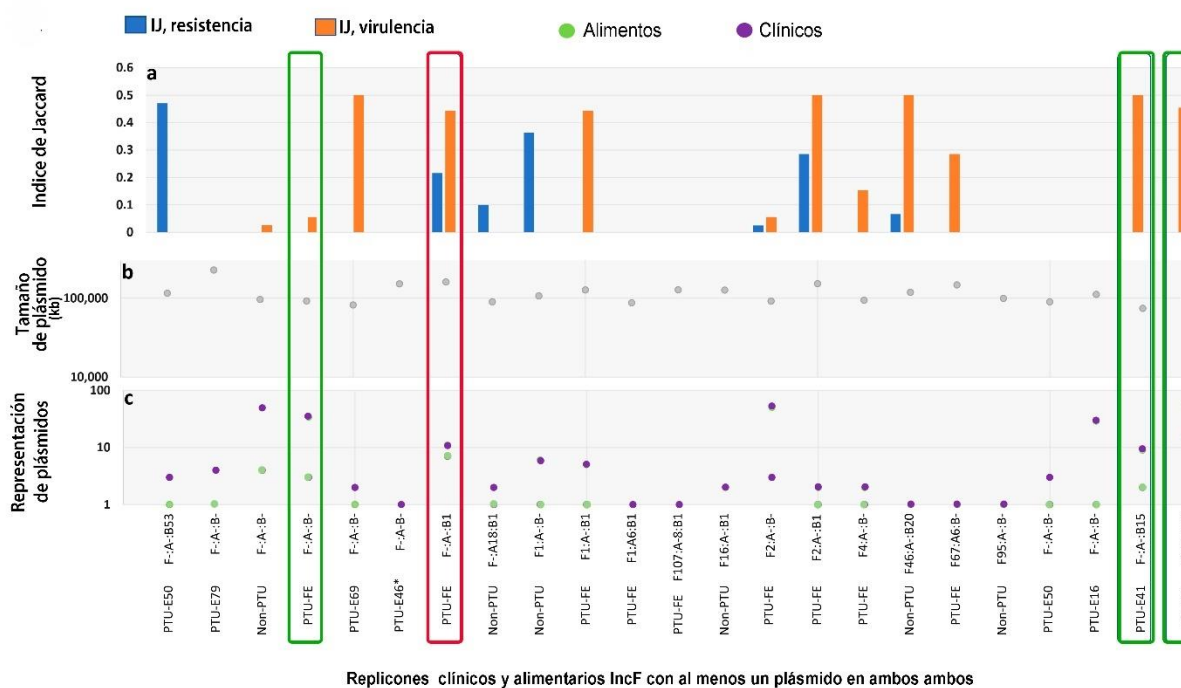
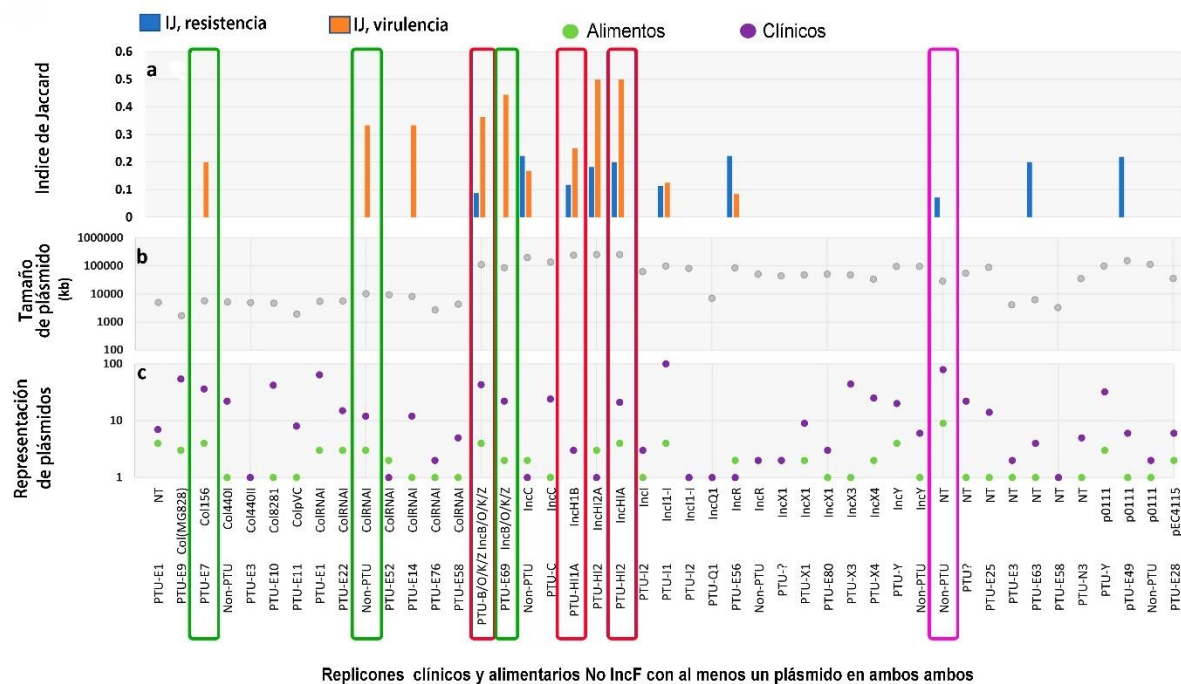
Grupo Inc (primera columna) y Grupo PTU (quinta columna) enumera las réplicas con al menos tres plásmidos representados en los conjuntos de datos de plásmidos clínicos y alimentarios. JI resistencia indica el valor del Índice de Jaccard para la presencia de genes de resistencia, JI virulencia indica el valor del Índice de Jaccard para la presencia de genes de virulencia, y JI total indica el valor del Índice de Jaccard para la presencia de la suma de genes de virulencia y resistencia.

Las PTU representan una clasificación filogenética a diferencia de la clasificación por grupo de incompatibilidad, con este argumento se realizó nuevamente la cuantificación de coocurrencia mediante el índice de Jaccard para cada PTU, estos resultados se muestran en la **Tabla 7.2**. En este caso, mientras que el índice promedio se mantuvo igual, los valores más altos aumentaron considerablemente (hasta 0.38). Los tres PTU con los valores más altos fueron PTU-E50 (IJ=0.38), PTU-HI2 (IJ=0.24) y PTU-FE (IJ=0.23). El aumento en los valores máximos de JI para la resistencia en los PTU, una clasificación que indica plásmidos relacionados filogenéticamente; este hallazgo aunado a que los 1/3 partes de los plásmidos que contenía genes de virulencia o resistencia a los antibióticos se encontraban vinculados con la capacidad potencial de transferencia ya que fueron descritos como móviles (68.3%, 62.2%, respectivamente), refuerza la teoría de que el intercambio de ARG entre los alimentos y las cepas clínicas podría estar dominado por un grupo específico de plásmidos filogenéticamente relacionados.

Ya que algunas PTU involucran múltiples grupos Inc, el siguiente paso fue observar todas las combinaciones de PTU-grupo Inc para plásmidos que están representados en ambos grupos, los resultados se muestran en la **Figura 7.11**. Debido a la gran cantidad de combinaciones de PTU y replicón, el tamaño promedio de la muestra se redujo sustancialmente; por lo que se realizó una representación de los plásmidos de cada

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

origen (**Figura 7.11** en el panel C). Debe tomarse en consideración que si se tiene un tamaño de muestra muy bajo en los orígenes se reduce la significancia del IJ, lo que implicaría una sobreestimación del valor, por lo que las conclusiones deben considerar esta información.



RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

Figura 7.11 Superposición de factores de resistencia y virulencia, desglosados por combinaciones específicas de grupos PTU-Inc. La primera sección presenta las combinaciones PTU-Inc, y la segunda sección muestra las combinaciones PTU-subtipo IncF. Cada una de las figuras se divide en **Panel A.** Índice de Jaccard (JI) de resistencia y de virulencia como indicador de superposición genética entre plásmidos alimentarios y clínicos. Los valores varían entre 0 (sin superposición) y 1 (superposición completa). **Panel B.** Muestra el tamaño promedio (pb) de los plásmidos asignados a cada una de las combinaciones de grupos PTU-Inc. **Panel C.** El número de plásmidos identificados para cada combinación de grupos PTU-Inc desglosado por fuente, alimento (circulo verde) y clínica (circulo morado). Los recuadros rojos indica el grupo que tienen 3 plásmidos o más de cada origen (clínico y alimentario) que cuentan con una coocurrencia con el contenido de ARG y genes de virulencia. Los recuadros verdes indica el grupo que tienen 3 plásmidos o más de cada origen (clínico y alimentario) que cuentan con una coocurrencia únicamente con el contenido de genes de virulencia. Los recuadros rosas indica el grupo que tienen 3 plásmidos o más de cada origen (clínico y alimentario) que cuentan con una coocurrencia únicamente con el contenido de genes de resistencia a antibióticos.

Con la consideración anterior, **Figura 7.11**, describe en la primera sección todas las combinaciones PTU-Inc, teniendo tres paneles, en el panel A se muestran los valores del IJ que siguen las mismas pautas anteriores para interpretar de manera correcta su importancia, la siguiente sección muestra el tamaño promedio de los plasmidos correspondientes a esa combinación PTU-Inc y en el ultimo panel la representación de los plásmidos clínicos y alimentarios, es decir, el número de plásmidos con la combinación PTU-Inc para evitar una sobreestimación inadecuada y concluir de manera correcta en aquellos que tuvieran un IJ superior >0.18 . Con lo anterior, podemos constatar que las combinaciones de PTU-replicón que parecen tener genuina presencia simultánea en el contenido de ARG y genes de virulencia son PTU-B/O/K/Z-IncB/O/K/Z (JI=0.09, con 43 plásmidos clínicos y 4 plásmidos de alimentos), PTU-HIA/IncHI1B (JI=0.12, con tres plásmidos en cada grupo) y PTU-HI2/IncHIA (JI=0.2, con 21 plásmidos clínicos y 4 plásmidos alimentarios) (**Figura 7.11** y **Tabla 2**). También se mostró la combinación PTU-E7/Col156 (JI=0.2, con 28 plásmidos clínicos y 4 plásmidos alimentarios) y Non-PTU/ColRNAI (IJ=0.32, con 12 plásmidos clínicos y 6 plásmidos alimentarios) específicamente para genes de virulencia.

Así mismo, dentro de los plásmidos IncF para mostrar la presencia preferente de genes de virulencia y resistencia se destaca la combinación PTU-FE/IncF(F-: A-:B1) (IJ=0.21, con 11 plásmidos clínicos y 7 plásmidos de alimentos). De igual forma nuevamente se

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

muestran combinación específicas para genes de virulencia PTU-E41/IncF(F-:A-:B15) (IJ=0.5, con 9 plásmidos clínicos y 2 plásmidos de origen alimentario), PTU-E5/IncF(F23:A-:B3) (IJ=0.42, 56 plásmidos de origen clínico y 15 de origen alimentario) y PTU-FE/IncF(F-:A-:B-) (IJ=0.69, con 32 plásmidos de origen clínico y 6 de origen alimentario) (**Figura 7.11 en la segunda sección**).

Los genes *aph(6)-Id*, *aac(3)-IId*, *aadA2*, *bla_{CTX-M-55}*, *bla_{TEM-1}*, *sul1*, *sul2*, *sul3* y *tet(A)* fueron albergados en los plásmidos localizados en los grupos señalados con los puntajes más altos de IJ (**Tabla 7.3**). De igual forma en el caso de los genes que codifican factores de virulencia, resalta el gen de enterohemolisina, *ehxA*, que se encuentra en cinco de las ocho categorías y es uno de los genes que está sobrerrepresentado en los plásmidos alimentarios, es decir, se encontraron con mayor frecuencia de lo que se esperaba encontrar si este evento sucediera al azar. Esta observación sugiere que la presencia elevada de este factor de virulencia en los alimentos probablemente se ve facilitado por la transferencia horizontal a través de plásmidos.

Tabla 7.3. Contenido génico de las combinaciones PTU-Inc con alto Índice de Jaccard.

Combinaciones PTU-Inc	Resistencia	Virulencia
PTU-B/O/K/Z IncB/O/K/Z	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>	<i>cia</i> , <i>cib</i> , <i>ehxA</i> , <i>epeA</i> , <i>espP</i> , <i>iha</i> , <i>subA</i> , <i>traT</i>
PTU-HI2 IncHIA	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA22</i> , <i>mcr-1.1</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>arr-2</i> , <i>bla_{CTX-M-55}</i> , <i>dfr14</i> , <i>linG</i> , <i>qnrS1</i> , <i>mphA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>	<i>terC</i>
Non-PTU ColRNAI		<i>cea</i>
PTU-E69 IncB/O/K/Z		<i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>toxB</i> , <i>katP</i>
PTU-HI2 IncHI2A	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>mcr-1.1</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	-
PTU-FE F-:A-:B1	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(3')-IIa</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>bla_{CTX-M-55}</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cvaC</i> , <i>ehxA</i> , <i>etsC</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>mchF</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>traT</i> , <i>tsh</i>
PTU-E41 F-:A-:B15	-	<i>ehxA</i> , <i>etpD</i> , <i>traT</i> , <i>etpP</i> , <i>nleA</i> , <i>cia</i>
PTU-E5 F23:A-:B3	-	<i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>etpD</i> , <i>toxB</i> , <i>katP</i>

En negrita, se muestran los genes que se encuentran en más de una categoría de las ocho enlistadas con el IJ más alto.

7.1.8 Discusión

A pesar de la limitante del análisis respecto a la fecha de colección de las cepas de *E. coli* a las cuales pertenecían los genomas, el número de la muestra (aproximadamente 10 veces menos genomas de origen alimentario que clínico) y del sesgo inherente de la distribución geográfica de países sobrerrepresentados debido a programas de vigilancia epidemiológica, los resultados obtenidos mediante este análisis cuantitativo y de estricto enfoque genómico, muestran superposiciones de importancia, al igual que la relación entre los genes y los grupos Inc y/o PTU, debido a que estos representan propiedades filogenéticas entre ambos grupos y además la mayoría de nuestras observaciones concuerdan con reportes previos en la literatura y también los amplían con el aporte de nuevos datos .

El análisis filogenético (**Anexo S5**), así como la comparación de los filogrupos, y secuenciotipos de ambos conjuntos de genomas, muestra un número menor de cepas en ambos orígenes, lo que sugiere que las cepas se intercambian entre ambos ambientes como poca frecuencia, excepto por aquellas cepas de *E. coli* que pertenecen al ST11, ya que su alta transmisibilidad a través de los alimentos es congruente con los estudios que informan que el clon EHEC O157:H7 que pertenece al ST11 está vinculado con brotes de infección humana causada por el consumo de carne contaminada (Omer et al., 2018). Así mismos estudios respaldan que EHEC O157:H7 (así como STEC) es un patotipo adaptado al ganado bovino y diseminado a los humanos a través del contacto directo con animales, sus heces o a través del ambiente o los alimentos contaminados (dos Santos et al., 2023; Grispoldi et al., 2020; Pianciola & Rivas, 2018).

Al observar el plasmidoma en ambas poblaciones, se presenta un número de plásmidos superior en los genomas clínicos respecto a los alimentarios; sin embargo, el estudio mostró características de tamaño y movilización similares en los dos conjuntos, por ejemplo; la mayoría de los plásmidos conjugativos eran grandes (25–200 kb), el límite de tamaño superior podría estar relacionado con los costos de adaptación de la transferencia de megaplásmidos (Romanchuk et al., 2014; San Millan & Maclean, 2019). En contraste, el 26.6% de los plásmidos movilizables eran muy pequeños (<20 kb), y que

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

plásmidos pequeños tienden a tener un alto número de copias (Millan et al., 2016); esto implicaría una posible compensación entre los diferentes tamaños de plásmidos para el acceso a la diversidad genética: la mutagénesis en plásmidos multicopia, que permiten la deriva genética al retener copias (Rodríguez-beltran et al., 2018) o bien el acceso un acervo genético mayor proporcionado por cepas bacterianas donadoras durante el proceso de conjugación, lo que produce en la cepa receptora depósitos de genes capturados de diversas fuentes clínicas y ambientales.

Uno de los principales hallazgos de este estudio es el gran número de genes de resistencia en plásmidos alimentarios, esto podría estar vinculado con el uso de antibióticos como profilácticos, metafilácticos, promotores de crecimiento en animales dedicados a la alimentación y el posterior uso del estiércol para cultivos (Lima & Domingues, 2020; Zalewska et al., 2021) o inclusive como contaminación durante el sacrificio y procesamiento de la carne (Lavilla Lerma et al., 2013; Oniciuc et al., 2019). Particularmente, se reporta una alta prevalencia de BLEE en cepas de *E. coli* en alimentos de origen animal, asociado al uso de antibióticos betalactámicos en la producción de animales de consumo descritos alrededor del mundo (Khalifa et al., 2024), vinculados a un número amplio de grupos de incompatibilidad en plásmidos (Madec & Haenni, 2018). Respecto a la comparación entre plásmidos alimentarios y clínicos, se observó que en aislamientos clínicos los genes que codifican para las BLEE se encuentran asociados con casi todos los tipos de plásmidos, aunque de manera más frecuente con ColRNA, IncF, IncI, IncN, IncX, IncH, NT y p0111; mientras que para los plásmidos alimentarios el Inc asignado resultó ser más restringido.

Particularmente, los carbapenémicos son antibióticos que se administran de manera exclusiva en humanos; sin embargo, se ha reportado un número cada vez mayor de cepas de *E. coli* resistentes a dicha familia de antibióticos aisladas fuera de los entornos hospitalarios de atención a humanos (Anjum et al., 2021; Nji et al., 2021). En este estudio se identificó el gen *bla*_{NDM-5} en un plásmido IncF (F1:A-:B-) (pF070, AP023237. 1) aislado de carne de cerdo; este plásmido había sido reportado anteriormente en un aislado de heces de un residente japonés (Sugawara et al., 2021). En alimentos *bla*_{NDM-5} ha sido reportado en *E. coli* proveniente de animales destinados al consumo humano

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

(vacas, aves de corral y cerdos) y albergados únicamente en plásmidos IncX3; (Tang et al., 2019; Wang et al., 2022), contrastando con nuestro hallazgo, alertando el hecho de encontrarlo en un plásmido IncF por su alta distribución.

También, se identificaron genes de resistencia a colistina (de la familia de las polimixinas) que sólo se usa como un tratamiento de último recurso en la clínica humana (Ahmed et al., 2020), aunque en contraste, es ampliamente utilizado en medicina veterinaria y esto podría explicar porque en la última década han surgido con mayor frecuencia reportes de cepas resistentes en todo el mundo aisladas en diferentes ambientes (Kim et al., 2022; Zhang et al., 2021), mediada por plásmidos (Anyanwu et al., 2020). También, se observó que una de las combinaciones del grupo PTU-Inc (PTU-HI2/IncHIA) se asoció con *mcr-1.1* en plásmidos alimentarios y clínicos, lo que sugiere que ese grupo específico de plásmidos puede actuar como facilitador de la transferencia horizontal de genes de resistencia a la colistina entre ambos orígenes, esto concuerda con lo reportado anteriormente en lo cual se describía junto con IncI2 y IncX4 como los plásmidos más frecuentes asociados al transporte de *mcr* (Matamoros et al., 2017).

Así mismo, en plásmidos alimentarios se encontró un alto número de genes de virulencia, particularmente factores que participan en adhesión. Ahora bien, las presiones para retener genes de virulencia probablemente estén relacionadas con la supervivencia en el animal que hospeda a la bacteria (en el caso de la carne y los productos lácteos) (Arimizu et al., 2019) o con permanecer adheridos a las superficies de los alimentos como el caso de vegetales, frutas u otros alimentos (Vassallo et al., 2023), viéndose involucrada la adaptación al entorno alimentario. De manera interesante, uno de los genes más frecuentes en plásmidos alimentarios fue el que codifica la enterohemolisina *ehxA* que ha sido catalogada como de importancia en cepas STEC vinculadas con ganado bovino y asociadas con derivados de productos cárnicos y que principalmente participa en la adherencia a las células del huésped, induce inflamación y ayuda a evadir las defensas inmunológicas (Hua et al., 2021) y *espP* que al igual que otros genes de virulencia (*etpD* y *katP*) se ha descrito previamente en el plásmido pO157 asociado principalmente con aislados de EHEC y ETEC. Aunque la función de *espP* es actuar como una proteasa que degrada proteínas del huésped, lo que ayuda a las bacterias a modular la respuesta

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

inmune y a favorecer la colonización y el daño tisular; mientras que la *etpD* es esencial para la formación del sistema de secreción tipo VI (SST6) y *katP* permite la evasión del sistema inmune (Schwidder et al., 2019). Probablemente, la alta frecuencia de aparición en los genes de virulencia en los plásmidos de origen alimentario se deba a la alta frecuencia de la presencia de ST11-EHEC en alimentos.

Por otro lado, considerando la superposición, es decir, la presencia de genes en plásmidos de ambos orígenes, los resultados de este análisis sugieren que algunas de las presiones selectivas operan en ambos ambientes. Este fenómeno es mayor respecto a los genes de virulencia, ya que en contraste hay una mayor presencia y diversidad de genes de resistencia en la clínica mediada por plásmidos, esto podría ser debido al uso de antibióticos de manera rutinaria como profilaxis y terapia. Además, se observó que la superposición en los genes de resistencia y virulencia se presentó en grupos Inc específicos, y aún más cuando se analizaron las PTU, que se consideran unidades genuinas relacionadas filogenéticamente, y todavía se enriquece cuando se observan combinaciones específicas de grupos PTU-Inc, lo que respalda nuestra propuesta de que la movilización de genes de virulencia, de resistencia o de ambos está dirigida por un grupo de plásmidos especializados entre *E. coli* de origen alimentario y clínico.

En conjunto, los resultados sugieren que los plásmidos encontrados en cepas de *E. coli* que contaminan los alimentos representan reservorios de genes de resistencia y virulencia y facilitan su intercambio genético con cepas clínicas a través de THG. El análisis de las características genómicas no sólo de la filogenia de las cepas sino de sus elementos genéticos móviles aislados en la clínica frente a cepas de alimentos, sostiene la premisa de la especificidad del nicho y el papel crítico de la transferencia horizontal para la propagación y el mantenimiento de la resistencia a los antibióticos y la virulencia (Day et al., 2019; Dorado-García et al., 2018, a Silva & Mendonça, 2012). En general, los resultados resaltan la importancia de aislar cepas de *E. coli* provenientes de alimentos, realizar su secuenciación del genoma completo y analizar su contenido de genes de virulencia, resistencia a antibióticos y plásmidos de todo el mundo para realizar la vigilancia epidemiológica y desde el punto de vista de la implementación de la información generada es que la identificación de combinaciones específicas de grupos

RESULTADOS: Análisis bioinformático de bases de datos públicas.

PTU-Inc que concentran la mayoría de la superposición de carga entre los plásmidos alimentarios y clínicos podría ayudar a diseñar estrategias para la vigilancia epidemiológica de los alimentos contaminados con *E. coli* y sumar esfuerzos para contener la resistencia antibiótica estudiando cepas no clínicas.

SEGUNDA ETAPA

7.2 Análisis de 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales en la ciudad de Puebla.

7.2.1 Determinación del número y tamaño de plásmidos por PFGE+S1

Se utilizaron 12 cepas de *E. coli* provenientes de vegetales de establecimientos fijos y ambulantes previamente caracterizadas como bacterias multidrogoresistentes, diez cepas fueron productoras de BLEE y 2 de CMY mediante PCR (Carreón-León, 2019). En el presente estudio se realizó el análisis de PFGE+S1 para conocer cantidad y el peso molecular aproximado de los plásmidos, mostrando que las 12 cepas portaban al menos un plásmido (**Anexo S6**). En total se identificaron 28 plásmidos con un tamaño entre 40 Kb y 250 Kb. El 46.4% (13/28) superaban los 100 Kb (**Tabla 7.4**). Se debe considerar la limitante de la identificación de plásmidos más pequeños en esta técnica (<6.8 Kb).

Tabla 7.4 Caracterización parcial del contenido de plásmidos de cepas de *E. coli*.

ID Cepa	Alimento	Establecimiento	¹ BLEE	Número de plásmidos (PFGE)	Tamaño (Kb)				
A6EC	Tomate	Fijo	+	5	127.7	85.1	65.9	44.1	40.3
A7EC	Pepino	Fijo	+	2	124.4	108.2			
A23EC	Espinaca	Fijo	+	1	157.8				
A38EC	Tomate	Fijo	+	2	241.2	125.8			
A44EC	Lechuga	Ambulante	+	3	102.9	96.8			
A65EC*	Cilantro	Ambulante	-	3	120.7	89.2	68.9		
A68EC	Cebolla/Cilantro	Ambulante	+	1	107.5				
A101EC	Cebolla/Cilantro	Ambulante	+	2	71.1	67.3			
A122EC	Rábano	Ambulante	+	2	101.2	97.9			
A134_1EC*	Cilantro	Fijo	-	4	107.2	95.8	83.1	65.0	62.4
A134_2EC	Cilantro	Fijo	+	2	135.8				
A143	Cebolla/Cilantro	Fijo	+	2	143.4	95.1			

* cepas con CMY-2

¹Carreón-León, 2019

7.2.2 Caracterización genómica de cepas de *E. coli* secuenciadas por Illumina.

Se procedió a secuenciar las 12 cepas de *E. coli* recuperadas del muestreo realizado por Carreón- León, 2019, diez de las cuales fueron productoras de BLEE y las dos restantes portaron CMY-2; así como al menos un plásmido por cepa. El resultado de la secuenciación mostró un promedio del tamaño del genoma después del ensamble de

RESULTADOS: Análisis de 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales

4.99 Mb, mientras que el porcentaje de GC (%GC) fue 50.5%. Además, se confirmó la identidad de *E. coli* para las 12 cepas con un valor de ANI en promedio de 99.98%. Cinco cepas pertenecieron al filogrupo A, mientras que 3 cepas fueron identificadas como B1, tres cepas más como C y únicamente la cepa A23EC perteneció al filogrupo B2. Los ST más prevalentes fueron ST155, ST746 y ST5019 correspondientes a dos aislamientos cada uno. Por su parte todos los serotipos fueron únicos a excepción de O86:H10 presente en los genomas A134_2EC y A143EC. En el caso de la variante de FimH todas fueron diferentes a excepción FimH149 presente en A134_2EC y A143EC; así como la variante FimH35 en las cepas A44EC y A122EC (**Tabla 7.5**).

Tabla 7.5 Caracterización de 12 genomas de cepas *E. coli* aisladas de vegetales.

ID	Contigs	Filogrupo	Serotipo	ST	FimH	%GC	Tamaño (MB)
A6EC	327	B1	O100:H34	155	121	50.3	5.2
A7EC	138	B1	O:H10	155	32	50.5	4.9
A23EC	274	B2	O25:H4	131	30	50.7	5.3
A38EC	302	A	O4:H4	746	1429	50.5	5.0
A44EC	146	C	O78:H9	23	35	50.5	4.9
A65EC	246	A	O:H37	746	31	50.7	4.9
A68EC	157	C	O:H9	410	24	50.6	4.8
A101EC	171	B1	O162:H10	101	111	50.4	4.9
A122EC	150	C	O78:H9	23	35	50.6	4.9
A134_1EC	262	A	O21:H48	10	54	50.5	5.1
A134_2EC	263	A	O86:H10	5019	149	50.6	5.0
A143EC	289	A	O86:H10	5019	149	50.7	5.0
Promedio	227	-	-	-	-	50.5	4.9

El ensamble se realizó con lecturas cortas provenientes de secuenciación de Illumina.
En negritas las cepas productoras de CMY-2

7.2.3 Identificación de genes de virulencia, resistencia a antibióticos y replicones.

Se identificaron 33 genes de resistencia diferentes, todas las cepas mostraron al menos 6 genes con un valor máximo de 14 en la cepa A134_2EC. Los genes estuvieron asociados a la resistencia contra aminoglucósidos (11), betalactámicos (6), trimetoprim (4), fosfomicina (3), sulfonamidas (3), fluoroquinolonas (3) y tetraciclinas (2) (**Tabla 7.6**). Además de acuerdo con el análisis de MGE, 30 genes se albergaron en plásmidos.

RESULTADOS: Análisis de 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales

Por otra parte, se identificaron 34 genes de virulencia, los aislamientos mostraron al menos 6 genes, resaltando que la cepa A23EC mostró un número máximo de 22 genes de virulencia. Los genes estuvieron asociados principalmente con colicinas (5), toxinas (5), adhesión (6), metabolismo de hierro (9), transporte (2), resistencia y sobrevivencia (4), hemolisina (1), hemaglutinina (2) (**Tabla 7.6**). En este caso únicamente el 32% (11/34) se encontró asociado a plásmidos.

Ahora bien, ya que todos los aislamientos mostraron la presencia de plásmidos de acuerdo a PFGE-S1 y que más del 90% de los genes de resistencia y un número importante de genes de virulencia se reportaron asociados a estos elementos móviles, se identificaron los replicones encontrando 14 diferentes, los cuales pertenecieron a IncFIA (1), IncFIB (10), IncFIC (7), IncFII(7), Col (pHAD289)(2), Col156 (2), Col(MG828) (5), p0111 (4), IncI1-I (2), IncI2(1), IncHI2 (1), IncQ1 (1), IncX1 (1) e IncY (1) (**Tabla 7.6**).

RESULTADOS: Análisis de 12 cepas de *E. coli* aisladas de vegetales

Tabla 7.6 Genes de virulencia y resistencia a antibióticos identificados en el genoma de *E. coli* aisladas de alimentos frescos.

ID de Cepa	Genes de resistencia	Genes de virulencia	Replicones	^a Número: tamaño de plásmidos (Kb)
A6EC	<i>bla</i> CTX-M-55, <i>dfrA1</i> , <i>fosA7.5</i> , <i>gyrA_S83L</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sat-2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cea</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>hra</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	Col (pHAD28), IncFIB, IncFIC, IncX1	*5:130,92,72,41,32
A7EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>gyrA_D87N</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>celb</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	Col156, IncFIB, IncFIC, IncFII	2:124,108
A23EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>bla</i> CTX-M-15, <i>gyrA_S83L</i> , <i>gyrA_S80I</i> , <i>mdfA</i> , <i>bla</i> OXA-1, <i>tet(A)</i>	<i>chuA</i> , <i>cnf1</i> , <i>fyuA</i> , <i>gad</i> , <i>hra</i> , <i>iha</i> , <i>irp2</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iucD</i> , <i>iutA</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>papA</i> , <i>papC</i> , <i>sat</i> , <i>senB</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i> , <i>usp</i> , <i>yfcV</i>	Col156, IncFIA, IncFIB, IncFII	*1:157
A38EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>aadA3</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>bla</i> TEM-1B, <i>dfrA12</i> , <i>fosA7.5</i> , <i>gyrA_S83L</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(C)</i>	<i>astA</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	IncFIB, IncFIC, IncHI2	*3:237,134,17
A44EC	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> TEM-1B, <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i>	<i>cia</i> , <i>cvaC</i> , <i>etsC</i> , <i>gad</i> , <i>mchF</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i>	Col (MG828), IncFIB, IncFII, IncI2, IncQ1, IncY	2:103,97
A65EC	<i>aadA2</i> , <i>bla</i> TEM-210, <i>bla</i> CMY-2, <i>dfrA12</i> , <i>dfrA14</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cia</i> , <i>gad</i> , <i>iss</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	IncFII, IncI1-I, p0111	*4:123, 93,63,5
A68EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>gyrA_D87N</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cea</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>fyuA</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>irp2</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>lpfA</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i>	Col(MG828), IncFIB, IncFIC	1:176kb
A101EC	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>bla</i> CTX-M-15, <i>fosA3</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>gad</i> , <i>hra</i> , <i>lpfA</i> , <i>papA</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>terC</i>	Col(MG828), IncFIB, IncFIC, IncFII	*4:98,95,79,37
A122EC	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> TEM-1B, <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>gad</i> , <i>cia</i> , <i>cvaC</i> , <i>etsC</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>gad</i> , <i>iutA</i> , <i>lpfA</i> , <i>mchF</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i>	Col(MG828), IncFIB	2:101,98
A134_1EC	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA5</i> , <i>bla</i> CMY-2, <i>dfrA17</i> , <i>fosA2</i> , <i>gyrA_S83L</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cia</i> , <i>astA</i> , <i>gad</i> , <i>hra</i> , <i>iss</i> , <i>terC</i>	IncFII, IncI1-I, p0111	*5:112,96,88,70,62
A134_2EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>bla</i> TEM-1B, <i>dfrA14</i> , <i>gyrA_S83L</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cea</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>hra</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	Col(pHAD28), IncFIB, IncFIC, IncFII, p0111	2:136,127
A143EC	<i>aac(3)-Ile</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>bla</i> CTX-M-55, <i>bla</i> TEM-1B, <i>dfrA14</i> , <i>gyrA_S83L</i> , <i>parC_S80I</i> , <i>qnrB19</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	<i>cea</i> , <i>cma</i> , <i>cvaC</i> , <i>gad</i> , <i>hlyF</i> , <i>hra</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>kpsE</i> , <i>kpsMII_K5</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>terC</i> , <i>traT</i>	Col(pHAD28), IncFIB, IncFIC, p0111	2:143,95

^aNúmero y tamaño de los plásmidos determinado por PFGE+S1. * Cepas secuenciadas por Illumina y Nanopore y ensambladas con Unicycler.

7.3 Análisis individual de la cepa A23EC aislada de espinaca

Después de analizar las características generales de las 12 cepas, se seleccionaron 6 para realizar un análisis más profundo. De acuerdo con el análisis bioinformático anterior la primera cepa seleccionada fue la A23EC aislada de espinaca (**Tabla 7.4**), se identificó dentro del filogrupa B2, ST131 y serotipo O25:H4 (**Tabla 7.5**), reportada como parte de un linaje altamente virulento. Además, mostró la presencia de seis genes de resistencia a antibióticos, incluyendo *bla*_{CTX-M-15} y fue confirmada como MDR. También, se determinó la presencia de 22 genes de virulencia, así como de un plásmido relacionado con cuatro replicones (**Tabla 7.4 y Tabla 7.6**).

Para obtener una mejor resolución del genoma se utilizó ensamble híbrido con lecturas largas por Nanopore MinION con la cual se obtuvieron dos contigs de 5.2 Mb y 157 Kb, identificados como cromosoma y plásmido, respectivamente. Así mismo, el nuevo ensamble permitió identificar 14 genes de virulencia adicionales (*csgAB*, *malX*, *yehABCD* y *fimABCDEFGF*), el gen asociado a la resistencia de cloranfenicol, *catB3* incompleto, cuatro genes asociados a la resistencia a metales (*baeRS*, *cpxA* y *pmrF*), 25 genes que codifican para biocidas (*acrABDFS*, *evgAS*, *mdtBCEFGHMNOP*, *marA*, *emrABEKRY* y *tolC*) y el operón *KpnEF* asociado a la tolerancia al estrés térmico.

7.3.1 Análisis filogenético de A23EC

Para ubicar a la cepa A23EC en el contexto global de genomas ST131 se realizó un análisis filogenético comparándola con 86 genomas ST131 reportados en las bases de datos libres. Este análisis permitió agrupar los genomas en los tres clados ST131 conocidos, a saber, A, B y C. Dentro del clado C, se agruparon en dos subclados principales (C1 y C2). Dentro del subclado C2, vemos dos grupos monofiléticos distintos (sublinajes), que denominamos C2a (13 cepas) y C2b (18 cepas); de acuerdo con la agrupación, A23EC pertenece al sublinaje C2b, caracterizado este grupo por que 1) Llevan una estructura de transposón TnMB1860 flanqueada por elementos IS26. Este transposón está integrado cromosómicamente en todos los casos y su sitio de integración cromosómica en estos genomas es consistente con un único evento de captura. 2) Llevan una isla de patogenicidad similar a PAI II536 con un gen *cnf1* adicional.

3) Pertenecen consistentemente al virotipo E, siguiendo el esquema de genes de virulencia descrito por Nicholas-Chanoine en 2014 y los genes adicionales sugeridos por Barrios-Villa en 2018 (Nicholas-Chanoine et al., 2014; Barrios-Villa et al., 2018a) 4) frecuentemente albergan un plásmido F(31,36):A(4,20):B1. En la **Figura 7.12**, se muestra que los genomas contenidos en el sublinaje C2b corresponden en gran medida a cepas clínicas humanas, a excepción de tres cepas ambientales aisladas de aguas residuales. El origen geográfico de las muestras del sublinaje C2b incluye a Asia, Europa, Australia y América del Norte y del Sur (**Anexo S1**).

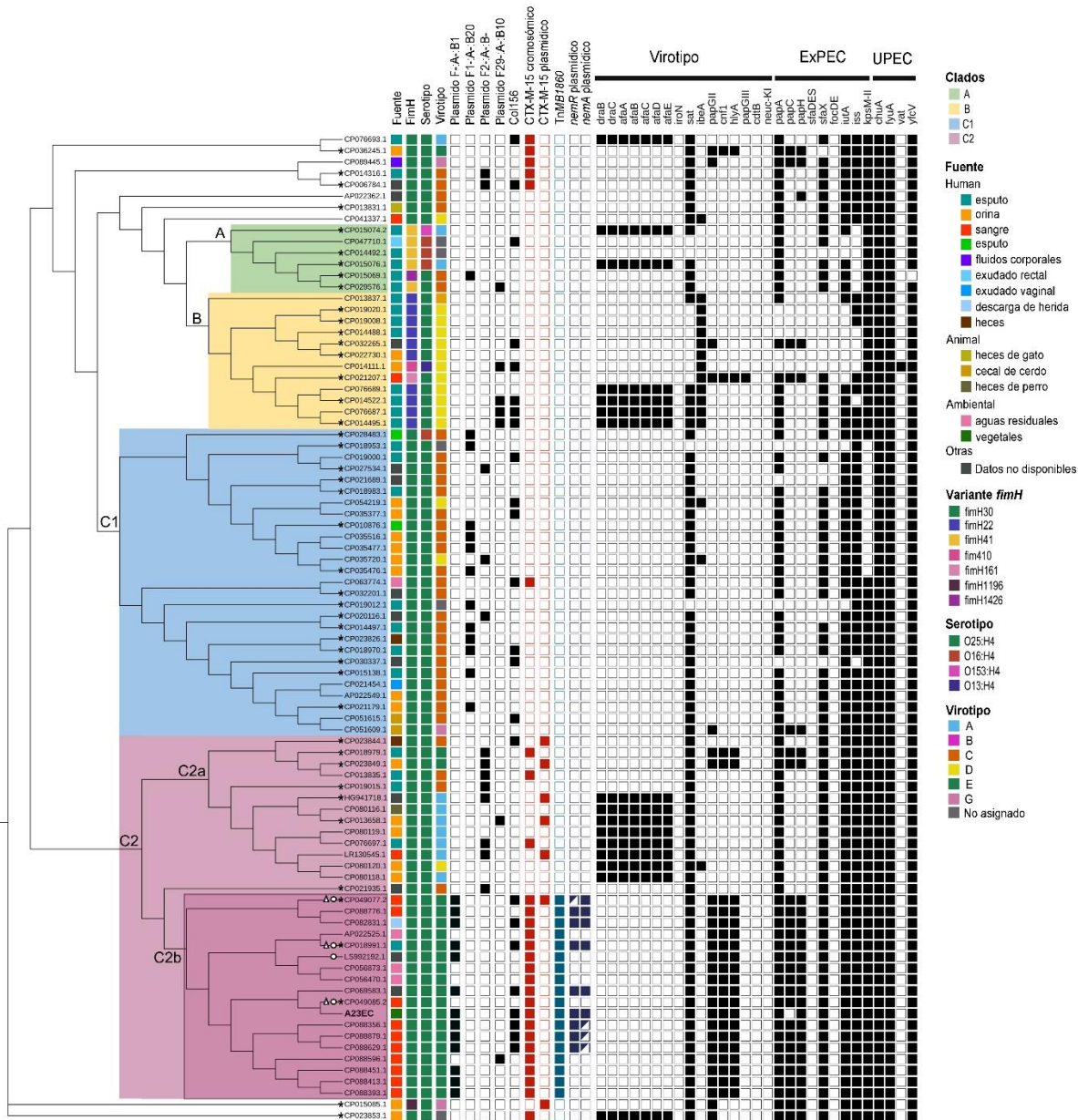


Figura 7.12. Filogenia de la cepa A23EC (en negritas) en el contexto de genomas ST131 de la base de datos GenBank. El asterisco indica todas las cepas utilizadas también en el estudio de Biggel et al., 2022, el triángulo pequeño junto al número de acceso al *GenBank* indica las cepas pertenecientes al sublinaje C2b incluidas en el estudio de Biggel et al., 2022 (CP049077.2, CP018991.1 y CP049085.2) y el círculo indica las cepas incluidas en el estudio de Shropshire et al., 2021 (CP049077.2, CP018991.1, CP049085.2 y LS992192.1). Las casillas rellenas indican la presencia de un gen determinado. La presencia de los genes *chua*, *fyuA* y *yfcv* fue determinada como potencialmente UPEC (Spurbeck et al., 2012). La identificación de los genes *sat*, *papGII*, *cnf1* y *hlyA*, de acuerdo con los criterios de Nicolas-Chanoine et al., 2014 y Barrios-Villa et al., 2018a catalogaron a la A23EC dentro de las cepas ST131 como parte del virotipo E

7.3.2 Viruloma de A23EC, ubicación y entorno genómico.

De los 28 genes de virulencia identificados, 24 se ubicaron en el cromosoma y específicamente 14 estuvieron contenidos en tres islas de patogenicidad, mientras cuatro genes fue ubicado en el plásmido (**Anexo S7**). La primera isla fue nombrada en este estudio como PAI I_{A23EC} y fue similar a PAI II₅₃₆ con una cobertura del 84% compartiendo trece genes de virulencia incluidos el operón *hlyABCD* (operón codificador de hemolisina) y el grupo de genes *papABCDEHKX* y *papGII* (adhesina de la punta de la fimbria P) (**Figura 7.13**). A diferencia de PAI II₅₃₆, PAI I_{A23EC} también contiene *cnf1* y *fimC*.

La segunda isla de patogenicidad denominada en este estudio como PAI II_{A23EC}, la cual mostró gran similitud con la PAI I_{CFT073} con una cobertura del 89%, que albergó a *sat* (toxina autotransportadora secretada), *kpsMII-K5* (variante de proteína capsular K5), al operón *iucABCD*, miembros de una familia de sideróforos independientes de la sintetasa de péptidos no ribosómicos (NIS), *iutA* (receptor férrico de aerobactina) e *iha* (adhesina homóloga del gen regulado por hierro).

Finalmente, la tercera isla de patogenicidad es PAI III_{A23EC}. Esta PAI es similar a PAI II_{CFT073} correspondiente a la isla de alta patogenicidad (HPI) con una cobertura del 98% que incluye los genes de biosíntesis del receptor de yersinobactina y facilita la captación de hierro *irp2*, *fyuA* y *ybtAEPQSTX*. La principal diferencia es que la A23EC muestra un *irp1* intacto (**Figura 7.13**).

La cepa A23EC de acuerdo con su contenido genético y su comparación con esquemas previamente establecimos en otros estudios, fue determinada como ExPEC, (Dale & Woodford, 2015), además, fue clasificada como potencialmente UPEC (Spurbeck et al.,

2012) y establecida dentro del grupo de *E. coli* ST131 como virotipo E (Nicolas-Chanoine et al., 2014; Barrios-Villa et al., 2018a) (Figura 7.12).

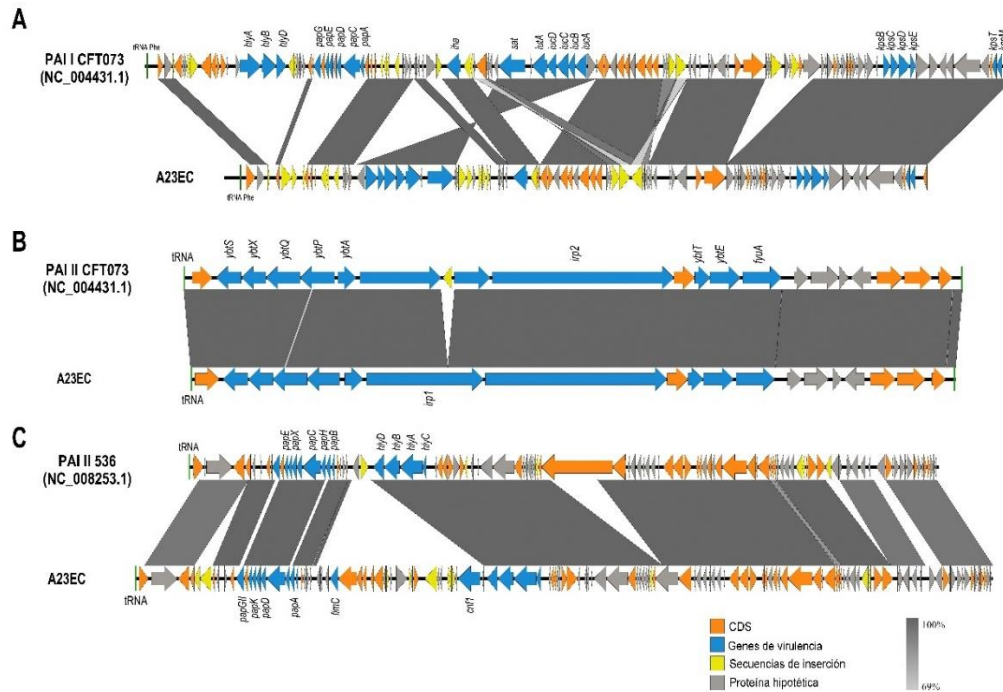


Figura 7.13 Comparación de la estructura genética de las tres islas de patogenicidad encontradas en A23EC con las PAI de UPEC. A. Comparación PAI-I CFT073-I/A23EC. B. Comparación PAI-II CFT073-II/A23EC. C. Comparación C. 536-II/A23EC. Las líneas grises indican las regiones con 69-100% de identidad por Blastn. La imagen se generó con EasyFig y los números de acceso de las secuencias de la cepa prototipo utilizada se colocaron entre paréntesis.

7.3.3 Perfil fenotípico y genotípico de resistencia a los antibióticos.

Los datos anteriores clasificaron a la cepa A23EC como MDR productora de BLEE y susceptible únicamente a carbapenémicos, fosfomicina, cloranfenicol y trimetoprima con sulfametoxazol.

La circularización del ensamblaje utilizando lectura largas permitió identificar al gen *mdfA* que codifica para una bomba de eflujo y está asociado a la resistencia a macrólidos; además se identificó un determinante de resistencia a la tunicamicina (*tmrB*) y el gen truncado $\Delta catB3$, este albergó dos deleciones en marco que involucran un total de 28 aminoácidos, reduciendo el tamaño de esta proteína de 210 a 182 aminoácidos, lo que da como resultado una pérdida de homología con respecto a la referencia que comienza

en la posición de aminoácido 147, eliminando así todo el dominio α -helicoidal C-terminal (**Anexo S8**).

Así mismo, la subunidad *gyrA* de la girasa y la subunidad *parC* de la topoisomerasa IV tenían tres mutaciones puntuales que conferían resistencia a las fluoroquinolonas: S83I, D87N en la girasa y S80L en la topoisomerasa IV.

Por su parte, en el cromosoma se identificaron los genes *aac(3)-Ile*, *tmrB*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}*, Δ *catB3*, *bla_{CXT-M-15}* y el gen *wbuC* (también conocido como orf477) contenidos en un fragmento modular de un tamaño de 12,837 pb flanqueado por IS26, denominado previamente como TnMB1860 por Shropshire et al., 2021. La unidad MB1860_A contenía los primeros 5 genes y se encontraba delimitado en el extremo 3' por un grupo Δ IS3, ISKpn11, IS26 y Δ Tn2. Mientras que el fragmento MB1860TU_B está delimitado por dos elementos IS26 en la orientación del sentido opuesto y contenía una secuencia ISEcp1 parcial (**Figura 7.14**).

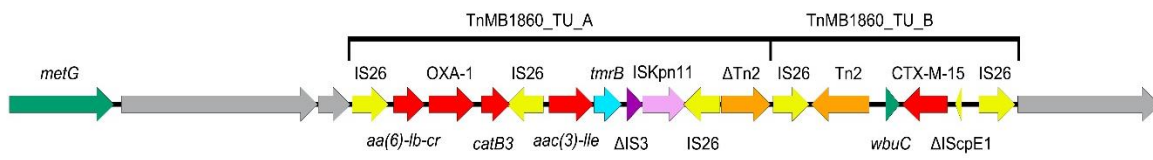


Figura 7.14 Estructura genómica y contexto genético de la secuencia TnMB1860 en la cepa de *E. coli* A23EC.

Se realizó una búsqueda del arreglo de TnMB1860 en 2387 genomas completos de *E. coli*. Se seleccionaron aquellas con una identidad de secuencia del 98% con una cobertura >70%, que tuvieran una disposición similar de los seis genes de resistencia dentro de una ventana de 20,000 pb; encontrando de esta manera 18 coincidencias altamente significativas (17 cromosómicas y 1 plasmídica). De manera interesante las 17 secuencias genómicas pertenecieron al sublinaje C2b del subclado C2 mostrado en la **Figura 7.12**. Al realizar el análisis de comparativo del transposón compuesto, se obtuvieron cinco agrupaciones. El grupo 1 estuvo integrado por la secuencia plasmídica p11A_p2 (180.962 pb), descrito anteriormente por Shropshire et al., 2021. A diferencia

de las secuencias cromosómicas, en p11A_p2 las unidades de TnMB1860 se encuentran separadas por un fragmento de 18,314 pb que contiene 13 ORF incluyendo varios factores de virulencia (**Figura 15**). Además, de forma interesante la cepa portadora del plásmido también albergaba a TnM1860 en el cromosoma perteneciente al grupo 3 junto a la A23EC. La presencia simultánea en un gen de resistencia en el cromosoma y en un plásmido dentro del mismo aislado no es infrecuente y se interpreta como una etapa intermedia en la incorporación de contenido genético de un plásmido al cromosoma (Wang et al., 2022).

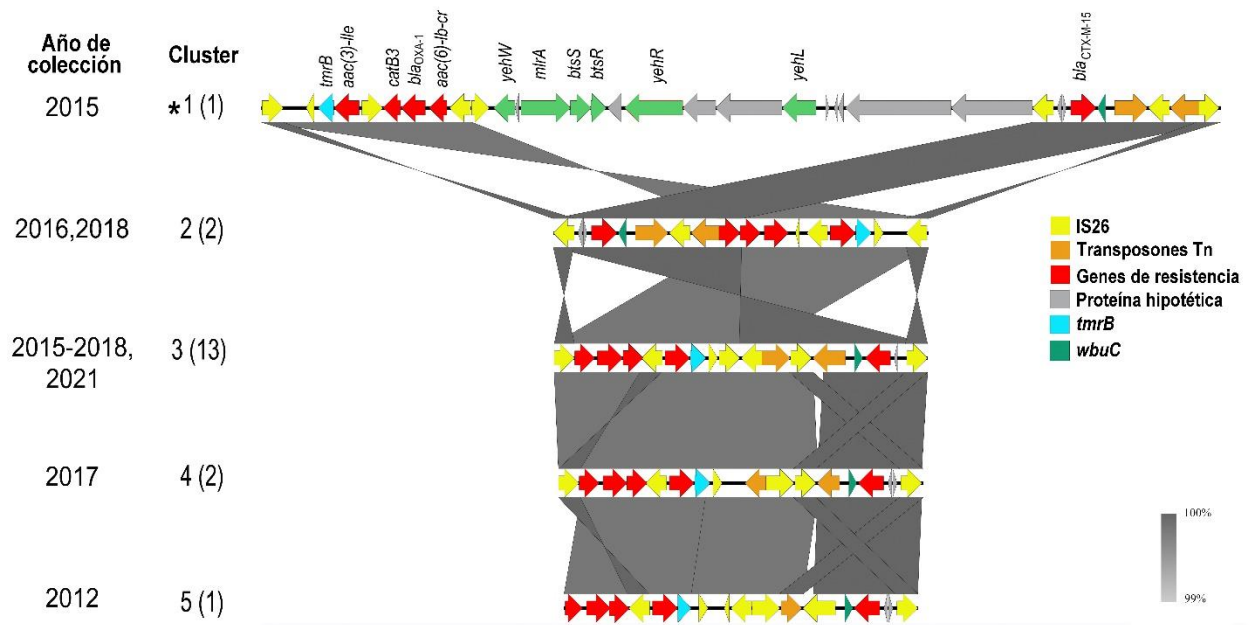


Figura 7.15. Disposición genética comparativa de TnMB1860 en genomas pertenecientes al sublinaje C2b. *Indica la secuencia plasmídica (p11A_p2).

Por su parte la cepa A23EC se localizó en el grupo 3 con otras 11 secuencias cromosómicas (**Figura 7.15**); en 10 genomas se identificó que el sitio de inserción de TnMB1860 se encuentra a ~4.400 pb del gen que codifica la metionil-ARNt sintetasa, *metG*, en un operón de biosíntesis del cofactor de molibdopterina (**Figura 7.16**). En la cepa restante (p4A; secuencia CP049085.1) el sitio de inserción se localizó adyacente al gen que codifica el receptor de colicina I, interrumpiéndolo (Δ *cirA*) (**Figura 7.16**).

Todos los demás grupos están integrados por dos secuencias que se comparan en la **Figura 7.16**; en el grupo 2, se muestra MB1860TU_B translocada río arriba de

MB1860TU_A en dirección inversa, con >99% de identidad entre ellas. Por su parte, en el grupo 4, se exhibe una pérdida de *Tn*. Por último, en el grupo 5, se presenta una pérdida de IS26 en el extremo derecho de la región TnMB1860TU_A, además, hay una inserción de 3,509 pb a diferencia de CP088879.1

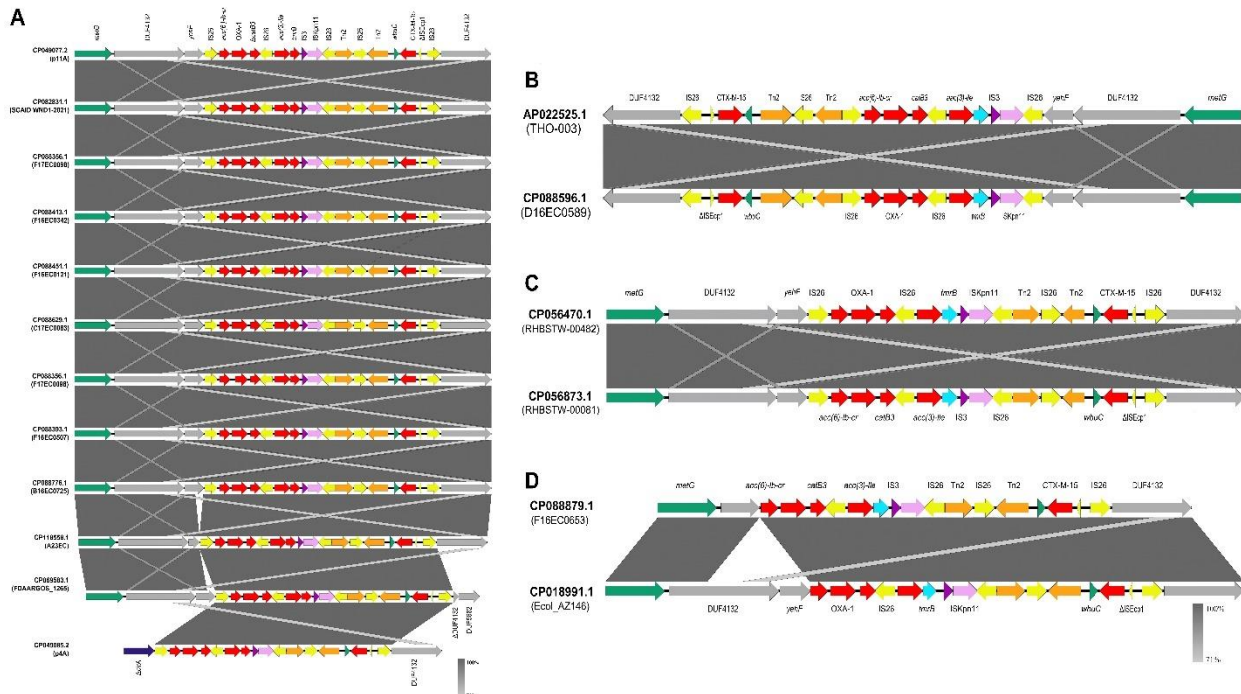


Figura 7.16 Alineación de los genomas contenidos en los grupos 3=A, 2=B, 4=C y 5=D. **Panel A.** Disposición genética comparativa de las secuencias en el grupo 3. En once de las secuencias, incluida la cepa A23EC, el sitio de inserción de TnMB1860 estaba cerca del gen que codifica la metionil-ARNt sintetasa, *metG*. En cambio, se insertó una única secuencia (CP049085.1) en el gen que codifica el receptor de colicina I truncado (*cirA*). **Panel B.** El grupo 2 contiene 2 secuencias, con MB1860TU_B translocada justo río arriba de MB1860TU_A en dirección inversa, con >99% de identidad entre ellas. **Panel C.** El grupo 4, con dos secuencias, mantiene >99% entre ellas. **D.** El grupo 5, con las dos secuencias, también presenta una pérdida de IS26 en el extremo derecho de la región TnMB1860TU_A; además, entre ellas en CP018991.1 hay una inserción de 3.509 pb a diferencia de CP088879.1. Comparación realizada con Easyfig v2.2.5.

7.3.3 Identificación y caracterización del plásmido (pA23EC).

Mediante PFGE+S1 la cepa A23EC mostró la presencia de un único plásmido (pA23EC), lo cual fue confirmado mediante la secuenciación del genoma completo y el ensamble híbrido. Se determinó que el tamaño de pA23EC es de 157,470 pb, con un contenido de

GC del 50,3% y 172 regiones codificantes putativas (CDS). Se identificaron *tetA* y *tetR* como parte de un operón asociado a la resistencia a la tetraciclina, flanqueados por *TnAs1*. Además, se identificaron cuatro genes de virulencia: *iutA*, *iucD*, *traT* y *senB*, relacionados con la captación de hierro, la resistencia sérica y como enterotoxina, respectivamente.

El plásmido contenía Col156, IncFII, IncFIA e IncFIB y se encontraron ampliamente separados entre sí; adicionalmente los alelos de IncF corresponden a la subclasificación F(31,36):A(4,20):B1. Así mismo, pA23EC perteneció a la PTU FE. Se encontraron tres sistemas toxina-antitoxina tipo II (*ccdAB*, *vapBC* y *pemKI*) y *parAB* que codifican un sistema de partición que asegura una segregación precisa del plásmido.

En la búsqueda de plásmidos similares a pA23EC, se encontraron 11 plásmidos (cobertura 76% al 99%) pertenecientes a genomas del sublinaje C2b descritos en la **Figura 7.12**. Se observa un área entre 50 kb y 80 kb que tienden a perderse en ocho plásmidos, esta área incluye los genes *nemR* y *nemA* asociados a la protección frente al estrés oxidativo y cinco plásmidos muestran la ausencia del gen de virulencia *senB* (que codifica la enterobactina, un sideróforo que permite a la bacteria captar hierro del entorno) y *repA* (Col156) (que codifica para una helicasa que es esencial para la replicación de este plásmido). Otra región propensa a la ausencia de genes se localiza ~110 kb, esta área incluye a los genes *iucD*, *iutA*, *parAB*, *vapBC* y *ccdAB*. Mientras que la resistencia a la tetraciclina solo se pierde en uno de los plásmidos (pTO217_2) (**Figura 7.17**).

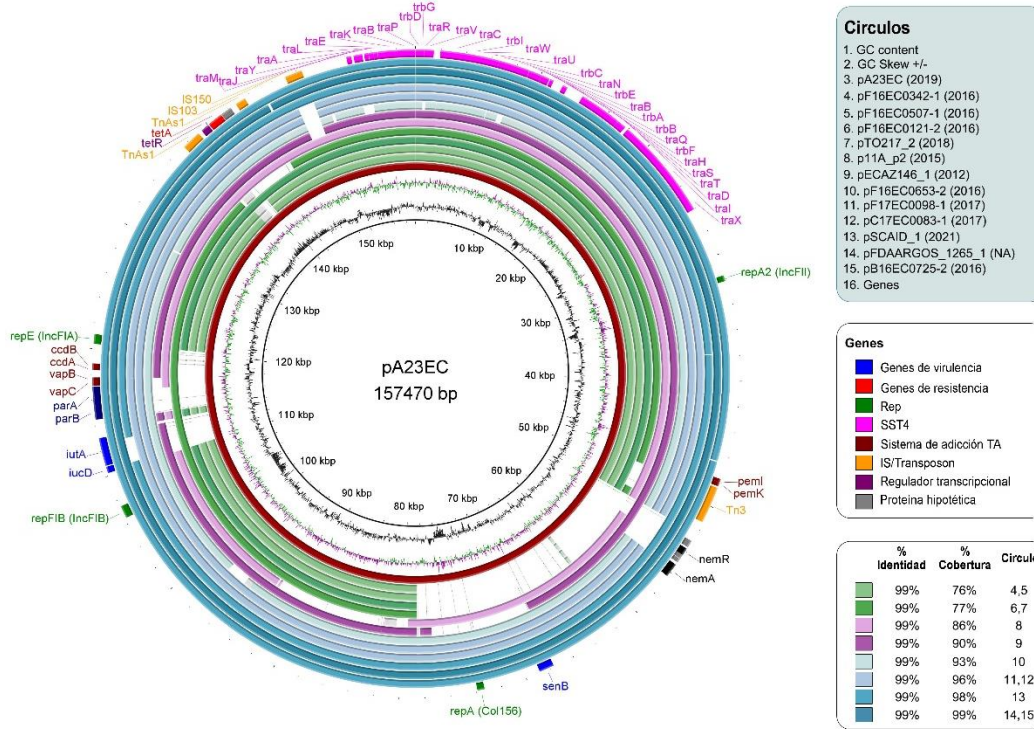


Figura 7.17 Análisis comparativo del plásmido pA23EC con los otros 11 plásmidos del subtipo FII_31/36:FIA_4/20:B1 identificados dentro del sublinaje C2b del subclado C2. El porcentaje de identidad y el porcentaje de cobertura de cada plásmido respecto a pA23EC están indicados en colores como se indica en la leyenda del recuadro inferior derecho y se muestran en orden de cobertura creciente.

Respecto a las características de movilización, el plásmido pA23EC se clasificó como conjugativo ya que presentó una secuencia *oriT*, la proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP) con dominios intactos, la proteína relaxasa tipo F (MOBF) y el sistema de secreción tipo IV (TSS4). Así mismo se realizó el ensayo fenotípico de conjugación de pA23EC a dos temperaturas, 20°C (la temperatura aproximada en el campo) y 37°C (temperatura corporal) y se confirmó su transferencia mediante la amplificación positiva y negativa de *tet(A)* y *bla_{CTX-M-15}*, respectivamente. A pesar de mostrar una baja frecuencia de conjugación se comprobó su transferencia con una frecuencia de $2,65 \times 10^{-5}$ a 37 °C y una frecuencia de $2,82 \times 10^{-5}$ a 20 °C, esta no difirió significativamente dependiendo de la temperatura (*t-student*, $p>0,05$).

7.3.4 Discusión.

De acuerdo con análisis genómico, se identificó que A23EC perteneció al clado C2, específicamente a C2b de ST131 que se reconoce en todo el mundo como un clon altamente virulento (Bonnet et al., 2021; Ludden et al., 2020). Así mismo, A23EC exhibió resistencia al menos a un antibiótico de las familias de aminoglucósidos, penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, quinolonas y monobactámicos, y se clasificó como productora de BLEE mostrando una alta resistencia lo que disminuye el repertorio de antibióticos que son efectivos para el tratamiento (Tacconelli et al., 2018). La presencia en el cromosoma de *bla*_{CTX-M-15} y de mutaciones que confieren resistencia a las fluoroquinolonas en este caso mediada por mutaciones en *gyrA* y *parC* es congruente con la ubicación de esta cepa en el subclado C2 de ST131 (Pitout & Finn, 2020).

Particularmente, es interesante la presencia del transposón TnMB1860 identificado en el cromosoma de la mayoría de las cepas del clado C2b, ya que además de portar 5 genes de resistencia conocidos, también albergó TmrB que es una proteína de membrana que se une a ATP y que protege contra la exposición a la tunicamicina, uniéndose y funcionando como una bomba de eflujo (Bugg & Kerr, 2019). Dado que la tunicamicina no se utiliza como antibiótico en la clínica ni como promotor del crecimiento en animales (Hosain et al., 2021; Yoon et al., 2023), la presencia frecuente del gen *tmrB* aún no se encuentra esclarecida. Si bien, previamente el gen *bla*_{CTX-M-15} ya había sido reportado en cromosoma *K. pneumoniae* en las cuales se demostró su diseminación estable en entornos clínicos independientemente de la presión ambiental (Coelho et al., 2010; Yoon et al., 2020). La presencia de genes de resistencia en el cromosoma puede sugerir una estrategia bacteriana en la cual se asegura la sobrevivencia, diversidad y propagación; primero al mantener el gen de manera estable en el cromosoma, se evita la pérdida del mismo debido a la disminución de la presión selectiva u otros cambios en la transferencia plasmática, y segundo porque mediante elementos transponibles en el cromosoma podrían llevar nuevamente esta estructura a plásmidos conjugativos y de esta forma diseminarlos.

Por otro lado, se reportó la presencia del gen *catB3* parcial. El gen completo codifica para una acetiltransferasa de tipo B, que tiende a tener baja actividad contra el cloranfenicol,

y forma homotrímeros; sin embargo, un informe anterior, muestra que una cepa con este truncamiento exacto fue sensible al cloranfenicol (Hubbard et al., 2020); no obstante, el hecho de que $\Delta catB3$ se encuentre en TnMB1860 consistentemente en cepas del sublinaje C2b podría sugerir una función residual que se mantiene a través de la selección y que hasta el momento se desconoce.

Por otra parte, A23EC portó los siete marcadores de virulencia característicos de ExPEC, como se esperaba para ST131 (**Figura 7.12**) (van Hoek et al., 2016); adicional a esto, la presencia de *chuA*, *fyuA* y *yfcV* la identificó como una cepa potencialmente UPEC (Spurbeck et al., 2012) y su estado *papGII+* sugiere que puede ser particularmente virulenta, ya que esta adhesina promueve la inflamación en el tejido renal a través de la reprogramación transcripcional de las células renales (Biggel et al., 2020) y se ha encontrado frecuentemente en cepas de *E. coli* causantes de bacteriemias (Cuénod et al., 2023). También, los genes ubicados en las tres islas de patogenicidad identificadas se han relacionado con el desarrollo de infecciones invasivas (Tsoumts Meda et al., 2022), ya que favorecen la colonización e invasión principalmente descritas en cepas APEC (Ovi et al., 2023), así como el gen de la toxina *usp* asociado con cepas que causan pielonefritis, prostatitis y bacteriemia (Schwartz et al., 2023). También, la combinación particular de la presencia de genes de virulencia lo asignó al virotipo E (Merino et al., 2020).

De manera interesante, se determinó que A23EC pertenece a un sublinaje que se denominó C2b, caracterizado por albergar una estructura de transposón TnMB1860 flanqueada por elementos IS26. La coherencia entre los sitios de inserción y la agrupación observada de la representación de este transposón en el cladograma (que apunta a la transmisión vertical) sugiere que es probable que esto sea el resultado de un único evento de captura (Shropshire et al., 2021); cabe destacar que 16 de los 18 cepas pertenecientes al sublinaje C2b (**Figura 7.11**) se recolectaron después de 2014 (**Anexo S1**), lo que sugiere que C2b representa un sublinaje emergente del subclado C2; esto es congruente con otros reportes como el de Biggel et al., 2020, en el que mediante un análisis de *papGII+* dentro del clado C2, se distinguieron tres sublinajes; particularmente la subrama L1a se alinea perfectamente con el linaje C2b propuesto. Así mismo, un

segundo estudio, identificó un grupo monofilético de 22 cepas C2 enriquecidas en virulencia y en marcadores ARG, que los autores denominaron “subconjunto C2” (Pajand et al., 2021). Ambos grupos mostraron características de virulencia similares, la presencia del transposon *TnM1860* y la presencia de plásmidos del subtipo F(31,36):A(4,20):B1.

Dentro del grupo C2b, 13 genomas (incluida A23EC) mostraron la presencia de plásmidos subtipo F: F(31,36):A(4,20):B1 que puede anotarse como F-:A-:B1, asociado también con PTU-FE (que exhibe un rango de hospedador de III en una escala de seis grados). Así mismo, pA23EC se describió como un plásmido multireplicón (IncFIA/InFIB/IncFII/Col156), estudios previos de manera general han demostrado que el estado multirreplicón de un plásmido es una herramienta ventajosa mediante la cual un plásmido de un rango de hospedadores estrecho puede experimentar una replicación de amplio rango de hospedadores permitiendo que las bacterias mantengan plásmidos de replicones incompatibles. Además, esta característica puede ser un mecanismo importante subyacente a las respuestas bacterianas a entornos con alta presión de antibióticos (Wang et al., 2021). La presencia de plásmidos multireplicones IncF/Col156 en cepas clínicas (heces) se reportó previamente en 2020 por Hayashi y su equipo; aunque, estos pertenecieron al subtipo F1:A2:B20, al igual que el plásmido pA23EC mostraron una capacidad de conjugación reducida, presentando estabilidad en ausencia de presión selectiva (ciprofloxacino, 0,001 µg/mL) (Hayashi et al., 2020). Por otra parte, el estudio dirigido por Kondratyeva en ese mismo año, muestra que al analizar 880 secuencias de *E. coli* ST131, los plásmidos IncF[F1:A2:B20] se encuentran estrictamente en el clado C1, mientras que los plásmidos con subtipos IncF[F2:A1:B-] se asocian de manera exclusiva con cepas de *E. coli* ST131 del clado C2, así mismo, de manera interesante se observa que replicones similares a Col, entre ellos Col156 se encontraron solamente en cepas C1, contrastando con el hallazgo en este estudio donde la cepa A23EC que pertenece al clado C2 porta el replicón Col156; de la misma forma, Kondratyeva muestra que los plásmidos parecen estar restringidos a cepas de *E. coli* ST131, lo que indicaría presumiblemente son menos transmisibles (Kondratyeva, Salmon-Divon & Navon-Venezia, 2020).

El plásmido pA23EC mostró los elementos de la maquinaria de movilización y se confirmó su conjugación tanto a 20°C como a 37°C, sin diferencias importantes en su frecuencia; esto fue sorprendente ya que a pesar de que la temperatura ralentizó el crecimiento de ambas cepas (donadoras y receptoras), la conjugación no fue influenciada por este factor. Por lo tanto, este es el primer informe que muestra la conjugación eficiente de una cepa ST131 subclado C2 (C2b) a una temperatura inferior a 37°C, la PCR nos permitió confirmar que el gen *tetA*, así como los genes que codifican para las replicasas asociadas al IncFIA, IncFIB e IncFII se encontraron presentes en las transconjugantes y no así el gen CTX-M-15 determinado en el cromosoma de A23EC; sin embargo, cabe señalar que sería importante contar con la caracterización fenotípica de resistencia y de PFGE+S1. Esto sugiere a reservar de las limitantes que pA23EC tiene el potencial de propagarse mediante conjugación, no solo en hospederos humanos sino también en reservorios ambientales.

Finalmente, con base en estudios de vigilancia epidemiológica se ha propuesto que los productos agrícolas son vectores importantes para la circulación de cepas ExPEC resistentes a múltiples fármacos entre humanos, animales y el ambiente (Meena et al., 2023); sin embargo, de manera especial típicamente *E. coli* ST131 se ha reportado únicamente colonizando el intestino (Johnson et al., 2022; Morales Barroso et al., 2018) y cuando ocasionalmente se ha recuperado de alimentos son por lo regular productos animales como carne y productos lácteos y las cepas no pertenecen al subclado C2 (Reid et al., 2019; Song, Oh, Kim, Park, et al., 2020). El aislamiento de una cepa ST131 portadora de *bla*_{CXT-M-15} en un producto agrícola se ha informado antes en una única ocasión de un pepino amargo importado de la República Dominicana (Müller et al., 2016) aunque se ignoran más detalles sobre su clasificación molecular.

Se ha propuesto por varios autores que la recuperación de cepas ST131 de diferentes hospederos y nichos ambientales solo se considera como un desbordamiento de su nicho principal (humanos) (Finn et al., 2020); sin embargo, el reporte cada vez más frecuente de estas cepas en alimentos plantea preguntas complejas sobre el papel de los reservorios en la evolución y propagación de ST131 y la adaptación bacteriana y

RESULTADOS: Análisis de la cepa *E. coli* A23EC

resalta el aislamiento de cepas ST131 en alimentos como A23EC lo que amplía el conocimiento para comprender la epidemiología y la dinámica evolutiva de *E. coli*.

7.4 Análisis de las secuencias que portaban *bla*_{CMY-2} plasmídica.

7.4.1 Análisis de genomas de *E. coli* productora de CMY-2.

Las cepas A65EC y A134_1EC fueron aisladas de cilantro (**Tabla 7.4**) de un establecimiento fijo y otro ambulante respectivamente. Previamente se determinaron como resistentes al menos a un miembro perteneciente a la familia de los aminoglucósidos, betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol; por lo que se consideraron MDR (**Anexo S9**). Además, mediante la prueba tridimensional para la evaluación de la producción de CMY-2 (**ver métodos 6.7**) se determinó la producción de AmpC y se confirmó la presencia de *bla*_{CMY-2} por PCR.

El tamaño de los ensamblajes fue de 4.9MB y 5.2MB, respectivamente. Mediante el análisis de filogenia se reveló que ambas cepas pertenecieron al filogrupo A; la cepa A65EC perteneció al ST746, serotipo O:-:H37 y mostró la variante alélica FimH31; por otro lado, la cepa A134_1EC perteneció al complejo clonal ST10 CC10, un tipo de secuencia frecuentemente identificada en cepas alimentarias y clínicas; además, perteneció al serotipo O21:H48 y mostró la variante alélica FimH54 (**Tabla 7.5**)

7.4.2 Análisis del viruloma, resistoma y plasmidoma de cepas A65EC y A134_1EC productoras de CMY-2.

En ambas cepas se identificaron genes de virulencia implicados en la invasión (*asfA*), la adherencia bacteriana (*fimH*, *nlpI*), la resistencia al suero (*iss*), la adquisición de hierro (*sitA*), la resistencia al telurio (*terC*), hemolisina (*hlyE*) y las bacteriocinas (*cia*), así como un regulador negativo de AraC presente en el patotipo EAEC (*anr*) (Duan et al., 2020a; Mickey & Nataro, 2020). Adicionalmente, la cepa A65EC mostró la presencia de los genes *yehAB* asociados a la colonización e invasión, *traT* que codifica para una proteína de membrana externa implicada en la resistencia al complemento, *cib* que es una colicina y *terC* asociado a la resistencia al telurio (Wang et al., 2023) (**Tabla 7.7**). Por otro lado, A134_1EC mostró además la presencia de genes asociados a la producción de toxinas (*astA*), adhesión y colonización (*csgAB*), invasión celular (*tia*), modulador de virulencia

RESULTADOS: Análisis de las cepas A65EC y A134_1EC

global (*hha*) y un fragmento del gen de la aglutinina resistente al calor (*hra*) (Bondi et al., 2017; Prieto et al., 2016; Srinivasan et al., 2003) (Tabla 7.7).

Tabla 7.7 Características genómicas, viruloma, resistoma y plasmidoma de las cepas A65EC y A134_1EC portadoras de *bla*_{CMY-2}

Característica	A65EC	A134_1EC
Tamaño (bp)	4,996,749	5,236,802
GC (%)	50.3	50.6
No. de genes	5,428	5,172
Viruloma		
Genes de virulencia	<i>aslA, fimH, gad, hlyE, iss, nlpI, sitA, terC, yehAB, arn, cia, traT, cib</i>	<i>aslA, astA, fimH, csgAB, gad, hha, hlyE, iss, hra, nlpI, sitA, terC, tia, cia, anr</i>
Resistoma		
Aminoglucosidos	<i>aadA2</i>	<i>aadA5, aac(3)-IId</i>
Betalactamicos	<i>bla</i> _{TEM-103} , <i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{CMY-2}
Quinolonas		<i>gyrA_D87N, S83L, parC_S80I</i>
QRDR quinolonas		
Macrolidos		<i>mef(B), estT</i>
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	<i>sul3</i>
Fosfomicina		<i>fosA2</i>
Trimetoprim	<i>dfrA12, dfrA14</i>	<i>dfrA17</i>
Fenicoles		<i>floR</i>
Tetraciclinas	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
Resistencia a metales	<i>baeRS, cpxA, pmrF</i>	<i>baeR, cpxA, pmrF</i>
Biocidas	<i>acrABDEFs, evgAS, sitA, marA, emrABEKRY, tolC, gadWX, qacEΔ1, mdtABCEFGMNOP, bacA, msbA, rsmA, arnT, eptA, mdfA, vanG, leuO</i>	<i>bacA, acrABD, evgAS, mdtABCEFGHNO, msbA, leuO, vanG, emrABEKRY, tolC, gadWX, eptA, qacEΔ1</i>
Tolerancia al estrés termico	<i>KpnEF</i>	<i>KpnEF</i>

De la misma forma, ambas cepas mostraron genes que codifican la resistencia a diferentes antibióticos: aminoglucósidos (*aadA2*, *aadA5* y *aac(3)-IId*), betalactámicos (*bla*_{TEM-103}, *bla*_{CMY-2}), trimetoprim (*dfrA12*, *dfrA14* y *dfrA17*), sulfonamidas (*sul1* y *sul3*) y tetraciclinas (*tetA*). Adicionalmente, la cepa A134_1EC mostró el gen *florR* asociado a la resistencia a fenicoles y finalmente los genes *mefB* y *estT* relacionados con resistencia

a macrólidos; de manera interesante en el plásmido A134EC_p1 se identificó el gen *fosA2* asociado a la resistencia a la fosfomicina, gen que sólo había sido localizado previamente por otros estudios en el cromosoma de *E. coli* por otros grupos de investigación (Grilo et al., 2023; Ito et al., 2017) (**Tabla 7.8**). Por último, se identificaron un número mayor de plásmidos a los identificados inicialmente por PFGE+1S, esto podría estar asociado a plásmidos con tamaños similares (A134EC_p4 y A134EC_p5) o plásmidos más pequeños como en el caso de A65EC_p4 y pudieran no permanecer contenidos en el gel.

Tabla 7.8 Caracterización de los plásmidos contenidos en la cepa A65EC

Característica	A65EC_p1	A65EC_p2	A65EC_p3	A65EC_p4
Tamaño (bp)	122,897	95,058	71,700	4,047
GC (%)	50.4	49.8	50.1	35.7
No. de genes	143	127	80	6
Inc group (pMLST)	p0111	Incl1	IncFII	NT
MOB	MOB _H	MOB _P	MOB _F	MOB _Q
MPF	-	-	Tipo F	-
Categoría	Movilizable	Movilizable	Conjugativo	Movilizable
Genes de virulencia	-	<i>cib</i>	<i>arn, cia, traT</i>	-
Genes de resistencia	<i>aadA2, bla_{TEM-103}, sul1, dfrA12, tetA</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>	<i>dfrA14</i>	-

Tres plásmidos de la cepa A65EC se identificaron como p0111, IncF e Incl1 y pertenecían a PTU-E49, FE e I1; el plásmido más pequeño de 4.047 pb fue identificado en esta cepa como no tipificable de acuerdo con ambos esquemas. El plásmido A65EC_p3 mostraba todos los elementos de la maquinaria de conjugación, incluida la relaxasa de tipo F, por lo que se determinó que era conjugativo. Por su parte, los plásmidos A65EC_p1 y A65EC_p4 se identificaron con relaxasas de tipo H y Q y al igual que el plásmido A65EC_p2 se determinaron como movilizables ya que mostraban la ausencia de SST4 (**Tabla 7.8**).

Dos plásmidos identificados en la cepa A134EC se identificaron como Incl1, el resto se determinaron como p0111, IncFII e Incl2. Asimismo, las PTU reconocidas fueron PTU-I1, Y, NT e I2, respectivamente. Tres plásmidos se determinaron como conjugativos al presentar todos los elementos de la maquinaria de conjugación, uno se determinó como

movilizable al identificar la relaxasa tipo F y sólo uno se clasificó como no movilizable (Tabla 7.9).

Tabla 7.9 Caracterización de los plásmidos contenidos en la cepa A134_1EC.

Característica	A134EC_p1	A134EC_p2	A134EC_p3	A134EC_p4	A134EC_p5
Tamaño (bp)	111,510	96,484	88,133	69,707	61,961
GC (%)	50.5	47.2	51.4	53.3	42.0
No de genes	131	102	103	81	81
Inc group (pMLST)	Incl1	p0111	IncFII	Incl1	Incl2
MOB	MOB _P	-	MOB _F	MOB _P	MOB _P
MPF	Tipo I	-	-	Tipo I	Tipo T
Categoría	Conjugativo	Non Movilizable	Movilizable	Conjugativo	Conjugativo
Genes de virulencia	<i>cia</i>	-	<i>anr</i>	-	-
Genes de resistencia	<i>aadA5, aac(3)-lld, fosA2, dfrA17</i>	<i>bla_{CMY-2}</i>	<i>mef(B), sul3, floR</i>	<i>estT</i>	-

El mismo contexto genético para *bla_{CMY-2}* se encontró en ambas cepas; río arriba estaba *ISEcp-1-tnpA*, y río abajo tenemos *blc* y *sugE*. En la cepa A65EC_p2, el conjunto *ISEcp1-tnpA-bla_{CMY-2}-blc-sugE* estaba flanqueado por el gen *yggR* río arriba y *ais* río abajo (Figura 7.19A). En el caso de A134EC_p2, estaba flanqueado por el gen *ompD*. En este estudio, identificamos el arreglo *bla_{CMY-2}* en A65EC_p2 correspondiente a Incl1 y en A134EC_p2 identificado como p0111; ambos grupos de plásmidos coinciden con el estudio bioinformático con altos niveles de solapamiento con genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Figura 7.19B).

El plásmido A65EC_p3 mostró un 99,54% de identidad con el plásmido pAR_0081 (CP027535.1) albergado por la cepa AR_0081 de *E. coli* aislada de una muestra clínica, diferenciándose únicamente en la presencia del gen *ltrA* y dos copias de *ISSbo1* río abajo (Figura 7.19A). Por su parte, el plásmido A134EC_p2 mostró un 93,05% de identidad con el plásmido p2018-05-2CC_1 (AP027878.1) portado por una cepa de *E. coli* aislada de heces humanas (Figura 7.19B); sin embargo, carecía de la región de sección *ompD-sugE* que flanquea a *bla_{CMY-2}*, en cambio mostraba la presencia del gen *mcr-1.1* flanqueado por *ISAp1* descrito previamente por su facilidad de transposición (Poirel et al., 2017).

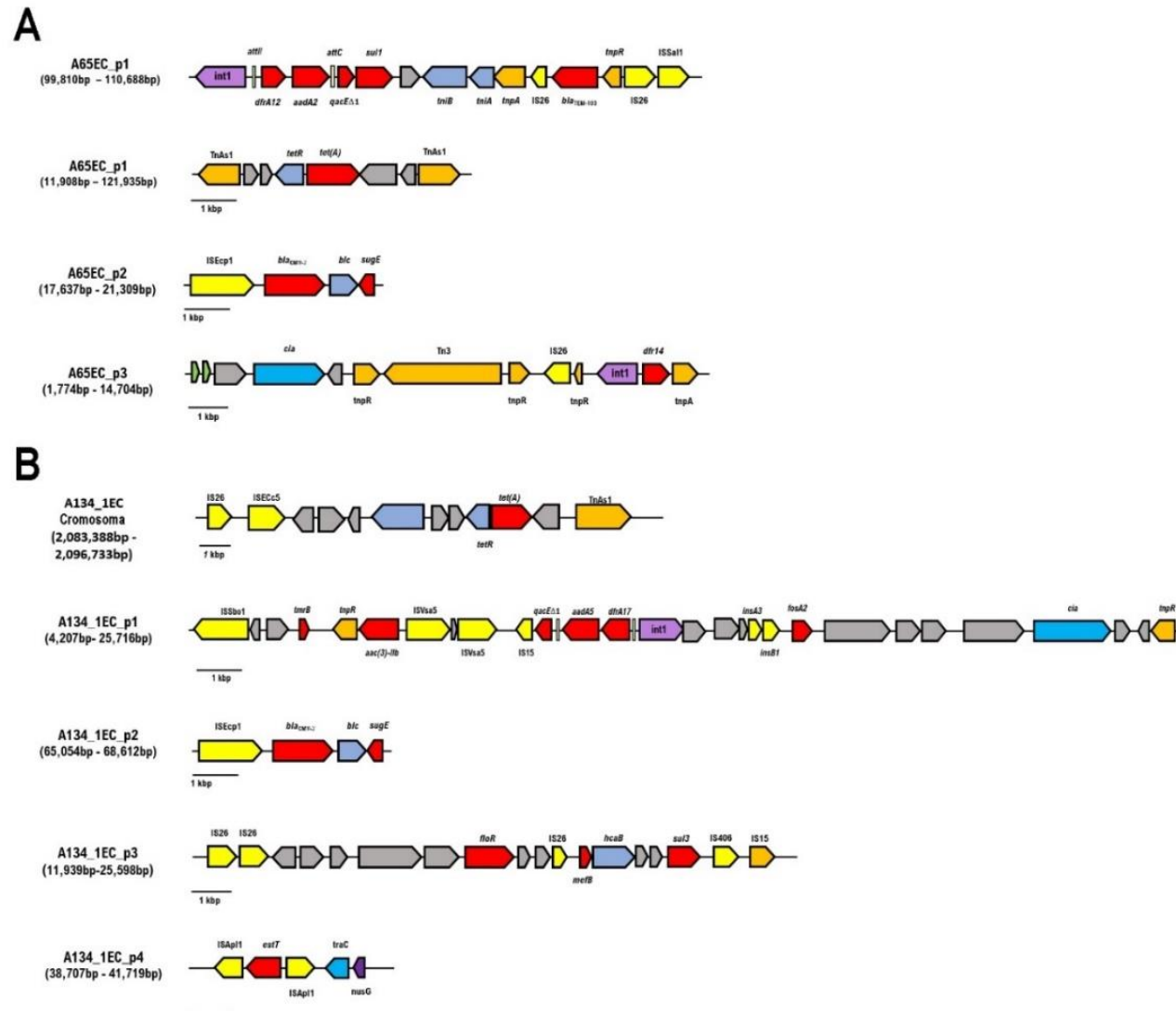


Figura 7.18 Estructura de los plásmidos de cepas productoras de *bla*_{CMY-2}. A. Cepa A65EC. B. Cepa A134_1EC, en este se muestra un segmento del cromosoma de la cepa A134_1EC. Los tamaños de cada plásmido se muestran en la Tabla 7.8 y Tabla 7.9.

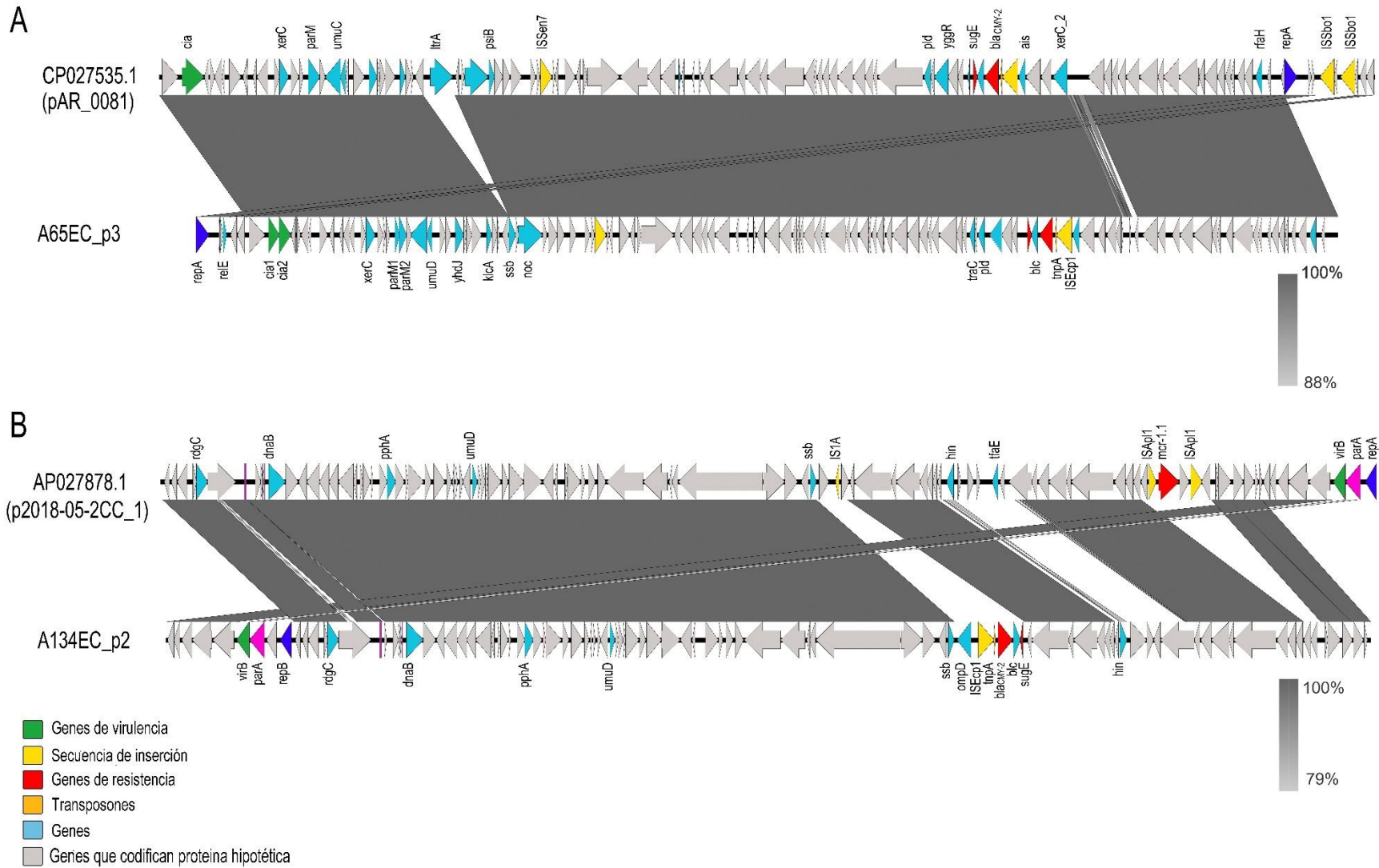


Figura 7.19 Alineamiento de A65EC_p3 y A134EC_p2 con los plásmidos reportados con mayor identidad y cobertura.

7.4.3 Discusión

El consumo de verduras crudas contaminadas con bacterias multirresistentes representa un riesgo importante para la salud humana. Se analizaron dos cepas aisladas de cilantro listo para el consumo: A65EC y A134EC, y aunque no pudimos considerarlas patógenas, más allá de la presencia de genes de virulencia, está claro que podrían funcionar como reservorios y donantes de genes de resistencia para bacterias patógenas establecidas. Adicionalmente, este panorama se ve reforzado por la presencia de varios plásmidos conjugativos y movilizables pertenecientes a grupos Inc descritos en el análisis bioinformático inicial como plásmidos portadores de genes de resistencia y virulencia no sólo en cepas transmitidas por los alimentos, sino también en cepas clínicas.

La cepa A65EC se identificó como ST746, este secuenciotipo se ha relacionado con cepas resistentes a carbapenémicos (Shin et al., 2021; Wang et al., 2021; Yang et al., 2022), y portadoras de genes de BLEE en peces (Sellera et al., 2018), aves silvestres (Haenni et al., 2020), cerdos (Peng et al., 2019) y pacientes humanos (Wu et al., 2018) de manera simultánea con genes *mcr* asociados a la resistencia a colistina (Anyanwu et al., 2021; Feng et al., 2021; Nakano et al., 2021), aunque esta es la primera vez que se relaciona con la producción de *bla*_{CMY-2}. Mientras tanto, la cepa A134_1EC fue ST10, en este caso el secuenciotipo es uno de los más frecuentes pertenecientes al filogrupa A. También es ampliamente conocido por ser ubicuo ya que se ha reportado entre *E. coli* aislada de animales, plantas, muestras clínicas humanas y del ambiente (Cummins et al., 2022; Riley, 2014), aunado a esto se han reportado cepas productoras de BLEE, *ampC*, y genes *mcr* aisladas de ganado vacuno (Ali et al., 2021; Lee et al., 2020), aves de corral (Ćwiek et al., 2021), humanos (Islam et al., 2023; Oteo et al., 2009) y aguas residuales (Davidova-Gerzova et al., 2023).

Además, identificamos que la cepa A65EC mostró una identidad del 99.77% con la cepa MDR S1-CAM-01-C (CP145718.1) aislada de heces de un individuo sano en Suiza, adicionalmente esta cepa portaba tres plásmidos y uno de ellos acarreaba *bla*_{CTX-M-14} y *mcr1.1*; así como genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas

y tetraciclinas. Por su parte, la cepa A134_1EC mostró una identidad del 99.47% respecto a la cepa LD27-1 (CP047594.1) resistente a colistina mediada por *mcr-1.1*, sin la presencia de plásmidos y aislada en el año 2018 a partir de heces de ciervo en China. Esto evidencia la amplia distribución de *E. coli* alrededor del mundo y su diferencia respecto a su contenido de plásmidos en relación con las cepas A65EC y A134_1EC sustentando nuevamente la adquisición de EGM entre cepas de alimentos, cepas clínicas humanas y animales; así mismo, es interesante como las cepas a pesar de no pertenecer al mismo ST, contaban con un número similar de plásmidos y estos pertenecían a los mismos grupos en ambas cepas Incl, IncF y p0111, la presencia de estos replicones conjuntamente había sido reportado en 2018 en dos aislamientos de *E. coli* ST219 aislados de un paciente con UTI recurrente (Kao et al., 2018) y en ambos casos solo los plásmidos IncF e Incl mostraron la capacidad de conjugación, esto también es congruente con los resultados obtenido del análisis bioinformático ya que propiedad conjugativa de los plásmidos p0111 era baja (<18%), esto podría indicar que la adquisición del *bla*_{CMY-2} por parte de p0111 sería más fácilmente atribuible a la participación de transposones pseudocompuestos flanqueados por IS.

.Por otra parte, el análisis genómico mostró la presencia de plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} ligados al entorno genético *ISEcp1-tnpA-blc-sugE* previamente descrito en cepas de *E. coli* de transmisión alimentaria y clínica humana y animal (Chiu et al., 2021; Yasugi et al., 2021) e incluso vinculado en otros géneros bacterianos principalmente *S. enterica* (Carattoli et al., 2018; Hage et al., 2020; Kürekci et al., 2021), lo que sugiere que esta estructura sigue propagándose y es la principal responsable de su expansión. Es bien conocido que *ISEcp1* desempeña un papel en la movilización de *bla*_{CMY-2} a otros plásmidos e incluso al cromosoma (Fang et al., 2018) y se ha descrito que tiene un papel adicional al ser el promotor responsable de la alta expresión de esta betalactamasa (Fang et al., 2015; Pietsch et al., 2018). Por otro lado, parte de esta estructura incluye al gen *blc* que codifica la lipocalina, una lipoproteína asociada a la membrana externa (Campanacci et al., 2006). Al mismo tiempo, se encontró presente el gen *sugE* (también conocido como *gdx*) que codifica para un miembro de la familia de pequeñas proteínas de membrana resistentes a múltiples fármacos (SMR) y está especialmente asociado a la resistencia frente a compuestos de amonio cuaternario (Jiang et al., 2020).

RESULTADOS: Análisis de las cepas A65EC y A134_1EC

En México, esta estructura ha sido descrita en *E. coli* y otras especies bacterianas en varios plásmidos Inc (Barrios-Villa et al., 2018b; Chiu et al., 2021), los más frecuentemente reportados alrededor del mundo son IncI1, IncA/C e IncK (Fang et al., 2015). En este estudio, identificamos el arreglo que transporta el gen *bla*_{CMY-2} en A65EC_p2 correspondiente a IncI1 y en A134EC_p2 identificado como p0111; ambos grupos de plásmidos han sido reportados en estudios previos con altos niveles de solapamiento con genes de virulencia y resistencia a antibióticos.

Este estudio es la primera vez en el mundo que se aíslan cepas de *E. coli* MDR productoras de CMY-2 en vegetales, ya que los reportes previos en México y el resto del mundo han sido en alimentos cárnicos (Barrios-Villa et al., 2018b; Wei et al., 2021; Zheng et al., 2022) resaltando la importancia del monitoreo y vigilancia de cepas resistentes a antibióticos en este tipo de alimentos, que se consumen sin cocinar. También respalda el papel de los alimentos como reservorio de cepas que albergan genes de resistencia a los antimicrobianos que pueden transferirse a otras bacterias comensales y patógenas.

7.5 Análisis fenotípico y genotípico de cepas resistentes a fosfomicina.

7.5.1 Resistencia fenotípica a fosfomicina y genes asociados.

En este estudio mediante el ensayo de Kirby Bauer se determinó que cuatro cepas mostraron resistencia a fosfomicina (A6EC, A38EC, A101EC y A134_1EC), posteriormente se determinó la MIC para cada cepa (**Tabla 7.10**), donde se observó que las cuatro cepas mostraban una MIC igual o superior a los 256 µg/ml.

Tabla 7.10 Caracterización de la resistencia fenotípica a fosfomicina y los genes asociados

ID Cepa	MIC fosfomicina (µg/ml)	Mutaciones asociadas a la resistencia a fosfomicina				
		<i>fosA</i>	<i>glpT</i>	<i>cyaA</i>	<i>ptsI</i>	<i>uhpT</i>
A6EC	256	<i>fosA7.5</i>	E448K	-	V251I	E350Q
A7EC	<32	-	E448K	-	-	-
A23EC	<32	-	E448K	-	-	-
A38EC	1024	<i>fosA7.5</i>	E448K	-	-	-
A44EC	<32	-	E448K	-	-	-
A65EC	<32	-	E448K	-	-	-
A68EC	64	-	E448K	-	-	-
A101EC	512	<i>fosA3</i>	E448K	-	-	-
A122EC	<32	-	E448K	-	-	-
A134_1EC	1024	<i>fosA2</i>	-	-	-	-
A134_2EC	128	-	E448K	S352T	-	-
A143	<32	-	E448K	S352T	-	-

E, Ácido glutámico; K, Lisina; S, Serina; T, Treonina; V, Valina; I, Isoleucina; Q, Glutamina.

Todas las cepas, excepto la A134_1EC mostraron mutaciones en los genes asociados a la biosíntesis de MurA, una enzima esencial para la formación del peptidoglicano (Eschenburg et al., 2005) y que es inhibida por la fosfomicina. El 92% (11/12) de las cepas mostraron la mutación E448K en el gen *glpT* mientras que el 17% (2/12) presentaron la mutación S352T en *cyaA* y sólo la cepa A6EC presentó las mutaciones V251I y E350Q, en los genes *ptsI* y *uhpT*, respectivamente.

Predominantemente, la resistencia a la fosfomicina está mediada por uno de los 11 alelos de *fos* (Falagas et al., 2016). Las cepas A6EC y A38EC mostraron la variante *fosA7.5*,

RESULTADOS: Análisis de las cepas A6EC, A38EC, A101EC y A134_1EC

mientras que las cepas A101EC y A134_1EC, portaron a *fosA3* y *fosA2*, respectivamente.

El análisis bioinformático identificó en todos los casos que los genes *fosA* fueron albergados en plásmidos con un tamaño superior a los 70 Kbp; al caracterizarlos observamos que los plásmidos A6EC_p3 y A101EC_p2, pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad IncFII, al igual que a la misma PTU-FE; aunque difirieron en el subtipo, ya que mientras que el primero fue identificado como F43:A-:B-, el segundo fue F2:A-:B. Para el caso de plásmido A38EC_p1 fue identificado dentro del grupo de incompatibilidad IncHI2A:IncHI2, y el plásmido A134_1EC_p1 fue IncI1. Así mismo todos los plásmidos portaban una relaxasa, MOB F, MOB H, MOB F y MOB P, respectivamente; sin embargo, solo tres (A6EC_p1, A38EC_p2 y A134_1EC_p1) presentaron un SST4 completo, por lo que fueron definidos como conjugativos.

Mientras que A6EC_p3 portaba exclusivamente el gen *fosA7.5*, los demás albergaban genes asociados a la resistencia contra betalactámicos (*bla_{CTX-M-55}*), aminoglucósidos (*aadA3*, *aac(6')-Ib*, *aadA5* y *aac(3)-IId*), trimetoprim (*dfrA12* y *dfrA17*) y tetraciclina (*tetA*) (**Figura 7.20**). Adicionalmente se identificaron genes de virulencia como el regulador negativo de AraC presente en el patotipo EAEC (*anr*) (Duan et al., 2020a; Mickey & Nataro, 2020), *traT* que codifica para una proteína de membrana externa implicada en la resistencia al complemento (Mageiros et al., 2021), la resistencia al telurio (*terC*) (Turkovicova et al., 2016) y la bacteriocina (*cia*) (Weaver et al., 1981).

Los plásmidos relacionados con los identificados en las cepas de vegetales que portaban *fosA* fueron CP122493.1 (77%), OQ078087.1 (82%), CP049172.1 (91%) y AP027878.1 (81%), provenientes de cerdo, carne de cerdo, humano y bovino en China, República Checa, Suiza y Reino Unido, respectivamente. De manera interesante ninguno de ellos albergaba *fosA*, lo que sugiere que la diseminación del gen en alimentos probablemente se deba a la transferencia horizontal entre diferentes cepas de *E. coli* en lugar de la expansión clonal de una única cepa *fosA* positiva.

RESULTADOS: Análisis de las cepas A6EC, A38EC, A101EC y A134_1EC

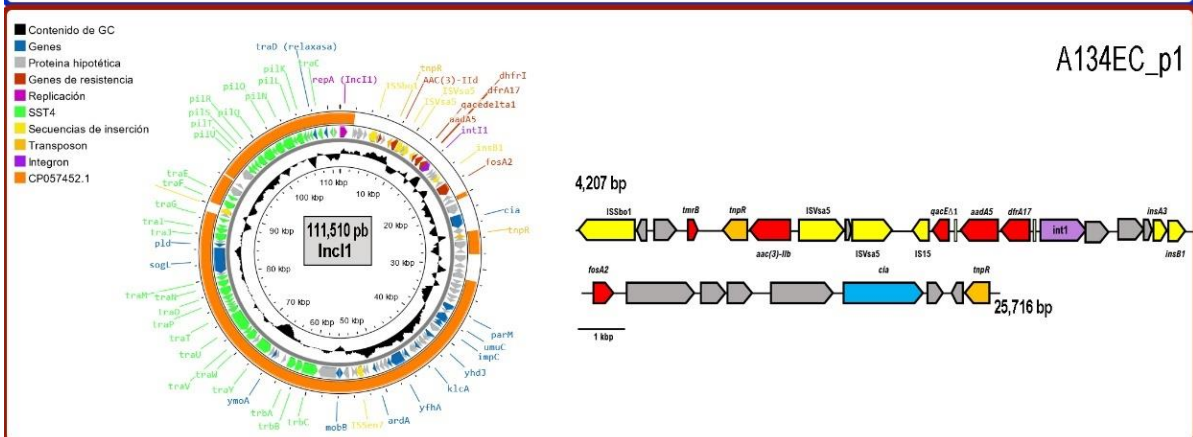
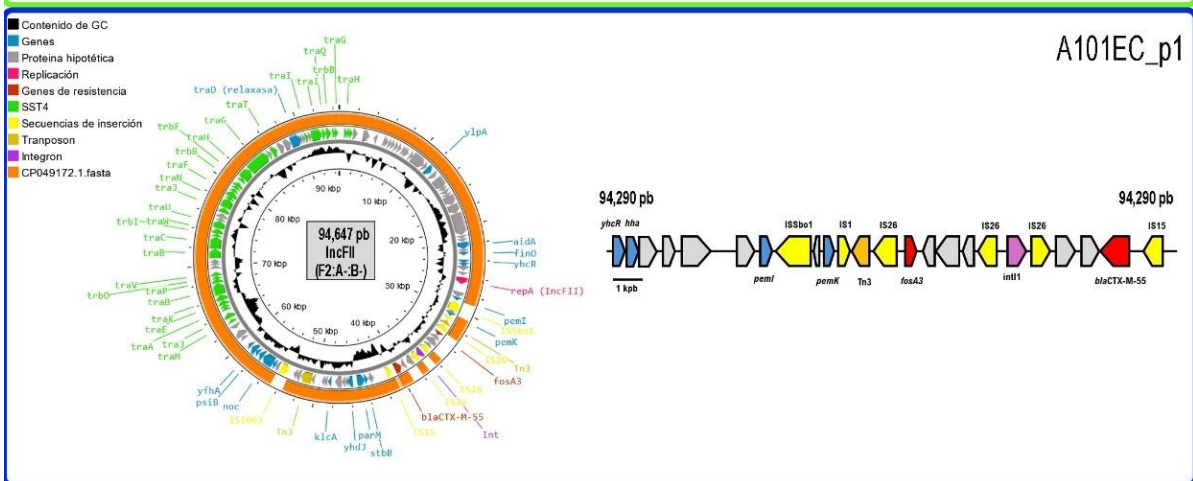
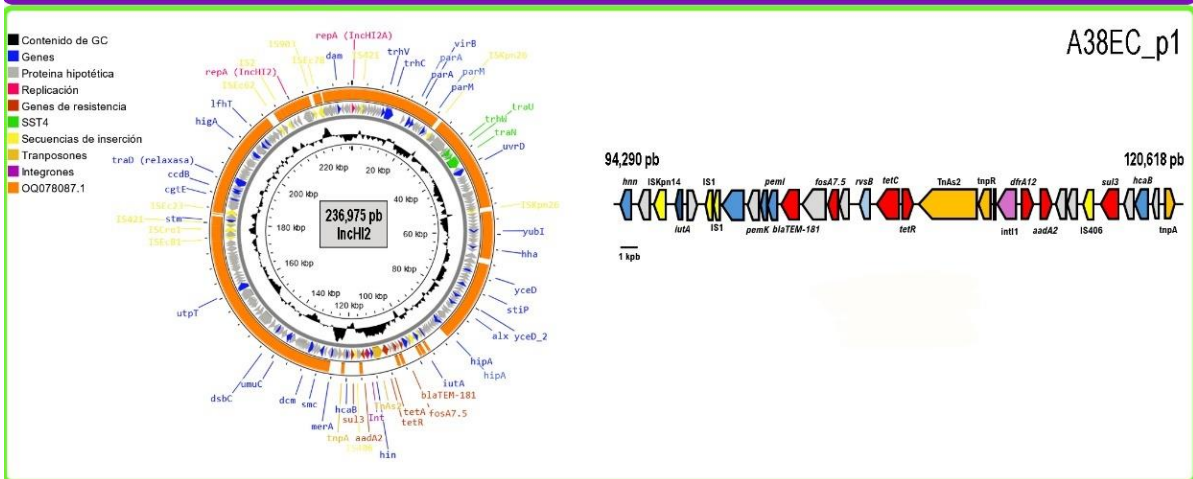
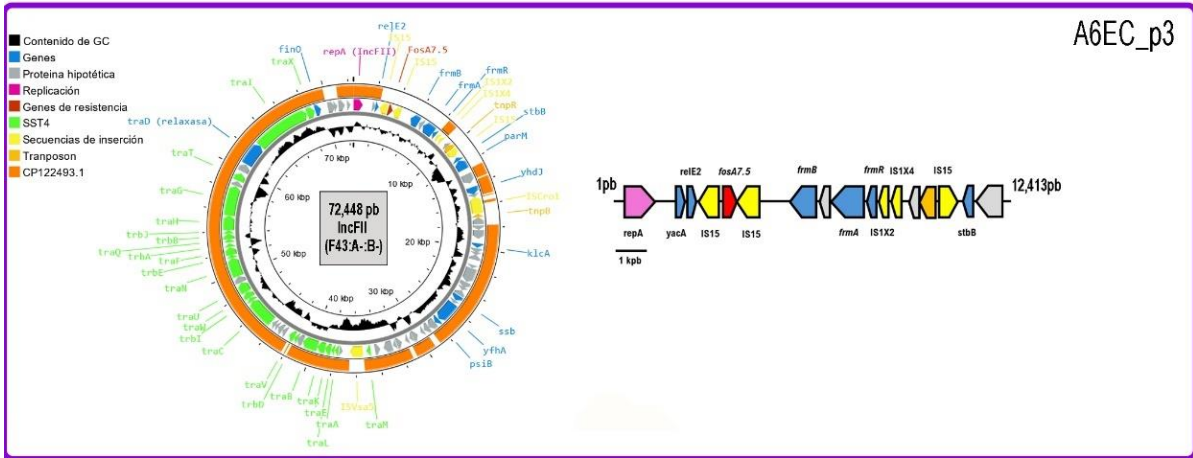


Figura 7.20 Estructura y comparación de plásmidos que albergan el gen *fosA*. Sintenia del gen *fosA*.

7.5.2 Discusión.

La cepa A6EC perteneció al ST155, un linaje que se ha involucrado como portador de *mcr-1.1* (Jun Feng et al., 2024) y productora de BLEE en aves de corral (Foster-Nyarko et al., 2021; Liu et al., 2022). Por su parte, la cepa A38EC se definió como ST746 y que anteriormente había sido relacionado con cepas resistentes a antibióticos de importancia clínica (carbapenémicos y colistina) y productoras de BLEE (Jie Feng et al., 2021; Sellera et al., 2018; Wang et al., 2021); así como recuperadas de diferentes hospederos (Haenni et al., 2020; Peng et al., 2019; Sellera et al., 2018; Wu et al., 2018). En el caso de la cepa A101EC fue identificada como ST101, un clon emergente que previamente se ha relacionado con cepas en brotes nosocomiales por cepas productoras de metalo- β -lactamasas (Mushtaq et al., 2011; Pfeifer et al., 2017; Yoo et al., 2013); así como relacionado a infecciones extraintestinales (Santos et al., 2020) aves silvestres y de consumo (Aeksiri et al., 2019; Kromann et al., 2023) y alimentos cárnicos (Sadek et al., 2020) caracterizadas generalmente como MDR. Finalmente, la cepa A134_1EC previamente la describimos como ST10, ya que también albergó al gen *bla_{CMY-2}*, este ST es caracterizado por ser ubicuo y presentar resistencia a múltiples antibióticos incluidos los de último recurso (Moura-Machado et al., 2024).

Los resultados mostraron que las cepas A38EC y A134_1EC tuvieron una MIC de 1024 $\mu\text{g/ml}$, esto es interesante porque no poseían la misma variante (*fosA7.5* y *fosA2*, respectivamente) y en el caso de la A38EC adicionalmente poseía una mutación en el gen *glpT* que codifica para el transportador de glicerol-3-fosfato (Law et al., 2009). Por su parte, la cepa A6EC además de presentar la variante *fosA7.5*, mostró mutaciones en los genes *glpT*, *ptsI* que codifica para la enzima I que es parte del sistema fosforilador de azúcar PTS (De Reuse & Danchin, 1988) y *uhpT* un antitransportador de hexosa-6-fosfato (Ambudkar et al., 1990); no obstante, la MIC fue de 256 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados sugieren que la variante de *fosA*, pueden tener un efecto directo en el fenotipo de resistencia, tal es el caso de *fosA2* (1024 $\mu\text{g/ml}$) con respecto a otras variantes (Yang et al., 2019) (en este caso *fosA7.5* presentada por A6EC) o la regulación de este gen en cada cepa está restringida a factores que se desconocen; sin embargo, al comparar esta cepa con la A38EC, plantea dudas interesantes ya que las mutaciones no parecen tener

un efecto sinérgico sino por el contrario un resultado opuesto, esto pudiera estar relacionado con el reporte de que la aparición de mutaciones en estos genes representan un mayor costo biológico en enterobacterias (Falagas et al., 2019), y verse condicionado el crecimiento bacteriano en el ensayo.

Por otra parte, la variante *fosA7.5* fue identificada en la cepa A6EC y A38EC, este alelo ha sido identificado en aislamientos clínicos humanos en Canadá (Milner et al., 2020), de animales de alimentación en Estados Unidos y China ((Haley et al., 2024; Zhang et al., 2023; Zhang et al., 2022) y de agua superficial de un canal de drenaje agrícola en Sinaloa, México (Lizarraga-Magaña, 2023). Esta variante se consideraba que en *E. coli* se localizaba estrictamente en el cromosoma (Mattioni Marchetti et al., 2023); sin embargo, uno de los reportes ha podido localizarlo en el plásmido a través de la secuenciación de lecturas largas (Milner et al., 2020) aunque no ha descrito su contexto genético. En este estudio se muestra que en A6EC el gen *fosA7.5* se encuentra flanqueado por dos secuencias IS15 que son miembros de la familia IS6, mientras que en el caso de la A38EC se identificó un cluster que inició con IS*Kpn14* y albergaba *bla*_{TEM-181}/*fosA7.5*/*TnsA1/tetC* seguido en un integrón clase I (*int1*) que acarrea *dfrA12/aadA2/sul3* (**Figura 7.20**). Este hallazgo pone de manifiesto que los entornos que parecen movilizar a *fosA7.5* en plásmidos es distinto a lo reportado cuando se localiza en el cromosoma, ya que en este caso principalmente se asociaba a ISL3 (Han et al., 2021; Mattioni Marchetti et al., 2023).

Mientras tanto, la cepa A101EC co-albergó *fosA3* y *bla*_{CTX-M-55} en un plásmido IncFII (F2:A-B-); el gen *fosA3* se ubicó en el contexto A, el cual es el más frecuente de los cinco reportados previamente (Wang et al., 2017) organizado en una estructura que comprende dos IS26 con la misma orientación que flanquean a *fosA3-orf3-orf2-orf1* (**Figura 7.20**); esta conjunción podría explicar su difusión exitosa y global (Marchetti et al., 2023). Particularmente, en esta cepa se identificó *fosA3* vinculado con un integrón clase I (*int1*) considerado como un indicador ambiental de contaminación humana (Gillings et al., 2015) además de que se conoce que están presentes en más del 80% de enterobacterias provenientes de humanos y animales dedicados a la alimentación (Liu et al., 2013; Marchant et al., 2013). Mientras tanto *bla*_{CTX-M-55} se encontró flanqueada por

IS26 en sentidos opuestos con la estructura *orf1-orf2-bla*_{CTX-M-55}. La asociación de ambos genes ha sido reportada en plásmidos IncFII, particularmente los subtipos F33: A-:B- y F2:A-:B- de aislamientos de *E. coli* provenientes de aves de corral (Cunha et al., 2017; Menck-Costa et al., 2022) y carne de pollo (Wong et al., 2016), en este hallazgo se debe hacer incapié ya que coincide con el análisis bioinformático de cepas clínicas y alimentarias provenientes de bases de datos públicas de la parte inicial en este trabajo que mostró que los plásmidos IncF(F2:A – :B –) fueron una de las combinaciones con los puntajes más altos para caracterizarlos como candidatos de mediar la transferencia horizontal de genes de virulencia y resistencia entre cepas alimentarias y clínicas.

Finalmente, la variante *fosA2* reportada en un plásmido IncI1 en la cepa A134_1EC_p1, al igual que la variante *fosA7.5* se había reportado únicamente de localización cromosómica (Mattioni Marchetti et al., 2023). Por lo que hasta el momento este es el primer reporte de un gen *fosA2* en una estructura plasmídica, que en este caso se encuentra flanqueado río arriba por *insB1* cercano a un integrón conformado *dfrA17/aadA5/qacEΔ1/aac(3)-Ib* y en otro extremo encontramos un gen de virulencia (*cia*). Además, de manera interesante *fosA2* sólo había sido reportado en *Enterobacter cloacae* (Huang et al., 2017; Xu et al., 2011).

Definitivamente, el incremento de cepas MDR conlleva opciones limitadas de tratamiento con antibióticos contra infecciones bacterianas (Bassetti et al., 2019), en este sentido la fosfomicina, como antibiótico relativamente antiguo (Reffert & Smith, 2014), ha adquirido importancia; sin embargo, la aparición y contribución de las enzimas inactivadoras de fosfomicina (FosABCL) acarreadas en plásmidos transferibles puede proporcionar potencialmente el mejor medio para la propagación de la resistencia a la fosfomicina en el futuro. Diversos autores señalan que la resistencia a fosfomicina aún es baja o moderada (Flamm et al., 2019; Ho et al., 2013); no obstante, en este trabajo se muestra no sólo la presencia de resistencia a fosfomicina en 4 de 12 cepas analizadas con valores mayor o igual a (\leq) 256 $\mu\text{g/ml}$; también, se evidenció la coexistencia con genes que confieren resistencia a otras clases de antibióticos como betalactámicos y aminoglucósidos principalmente. La aparición de cepas con estas características en fuentes alimentarias con un uso de fosfomicina escaso revela la problemática de

RESULTADOS: Análisis de las cepas A6EC, A38EC, A101EC y A134_1EC

diseminación a través otros elementos como la fertilización con productos no tratados (estiércol, guano y residuos orgánicos), fauna nociva, agua de riego o de descontaminación y manipulación humana.

7.6 Análisis de formación de biopelícula, adherencia e invasión.

7.6.1 Formación de biopelícula.

Los ensayos de formación de biopelícula de las cepas de vegetales a 20°C por 24 horas de acuerdo con el análisis de ANOVA fueron diferentes ($p > 0.05$); en el análisis posthoc se mostró que todas las cepas, excepto A6EC y A7EC poseían diferencias estadísticamente significativas (en orden 0.01, 0.001 y 0.0001) respecto al control (CFT073). Cuando se realizó el análisis nuevamente a la misma temperatura, pero esta vez por 48 horas, únicamente mostraron diferencias significativas las cepas A23EC, A101EC, A134_1EC y A143EC respecto al control; esto resulta interesante, ya que al comparar por pares (24 y 48 horas) (*t-student*) todas las cepas mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

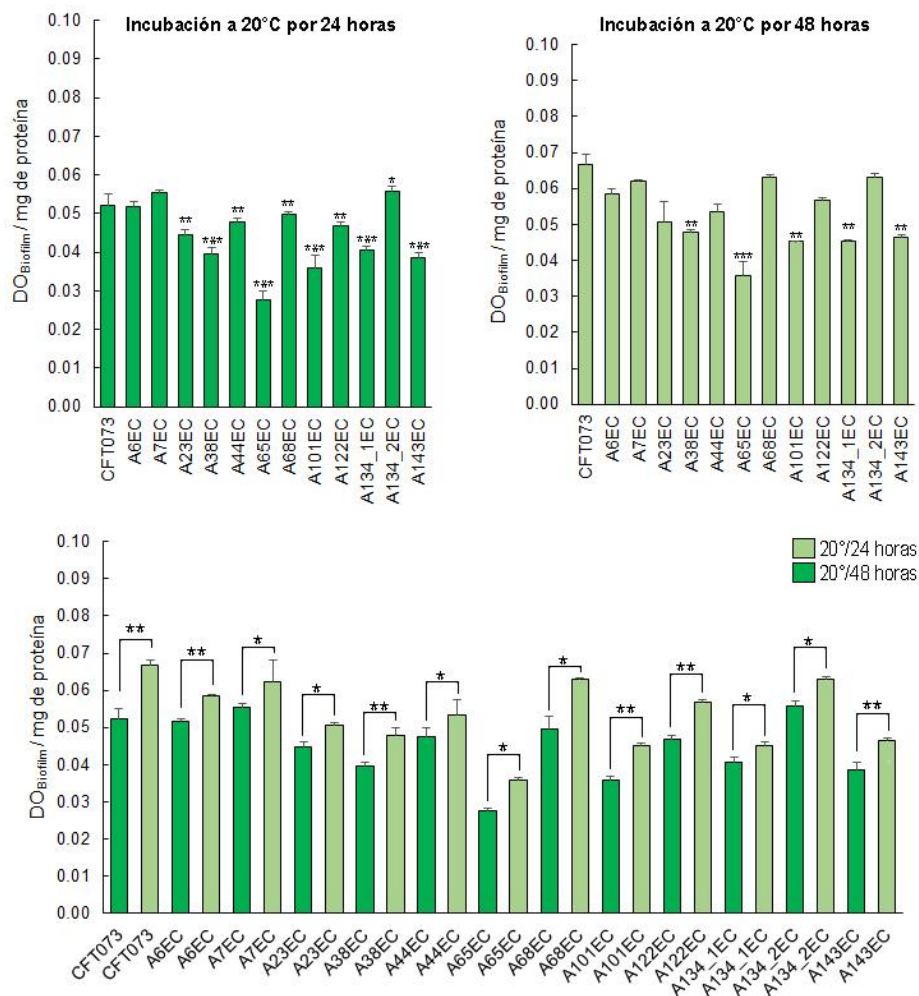


Figura 7.21 Comparación de la producción de biopelícula a 20°C por 24 y 48 horas.

* equivale a 0.01, ** equivale a 0.001, *** equivale a 0.0001

Por otra parte, cuando las cepas fueron incubadas a 37°C por 24 horas de acuerdo con el protocolo estándar de formación de biopelícula; nuevamente las cepas mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Se observaron seis cepas con una menor producción de biopelícula respecto al control: A65EC, A101EC y A143EC en un primer grupo (0.0001) seguidos de A23EC, A38EC y A134_1EC en un segundo grupo (0.01).

Al comparar la producción de biopelícula entre las cepas incubadas a diferentes temperaturas (20° y 37°C) por 24 horas únicamente 3 cepas (A23EC, A38EC y A101EC) mostraron diferencias significativas (*t-student*) en la producción de biopelícula.

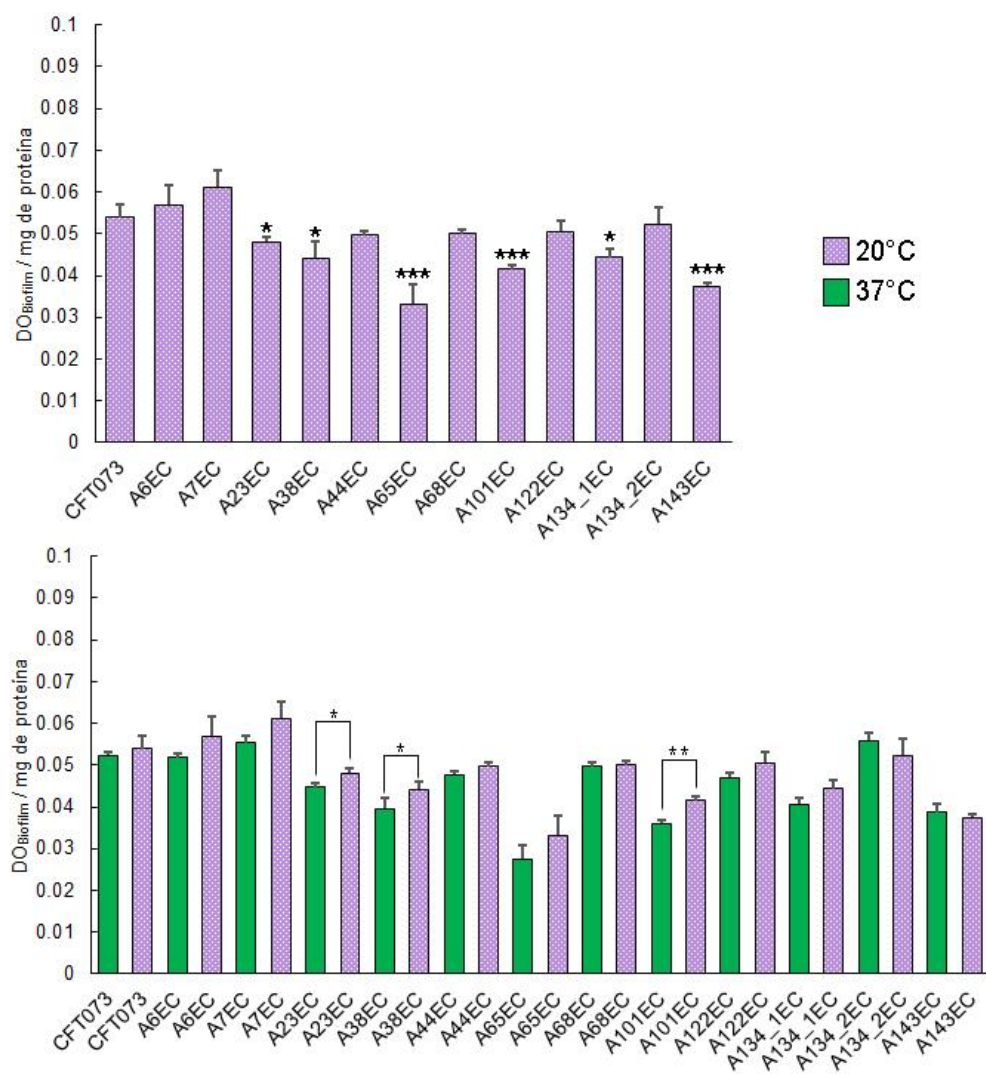


Figura 7.22 Comparación de la producción de biopelícula a 20°C/ 37° por 24 horas.

* equivale a 0.01, ** equivale a 0.001, *** equivale a 0.0001

Así mismo, se realizó la comparación de la producción de biopelícula en la superficie de la hoja de espinaca; en todos los casos, incluidas las cepas control, se mostró una mayor producción en la superficie del vegetal (*t-student*, $p < 0.05$). Aunque particularmente este incremento es menor en las cepas A23EC, A68EC y A122EC (**Figura 7.23**); esto indica que la cepa A23EC considerada potencialmente patógena por el análisis del **apartado 7.3**, tiene la capacidad de persistir fuera de hospedero; la siguiente cuestión a responder sería corroborar que esta cepa pueda desarrollarse sobre la superficie del vegetal, ya que indicaría que A23EC se ha adaptado a ambos nichos aumentando su capacidad de propagarse.

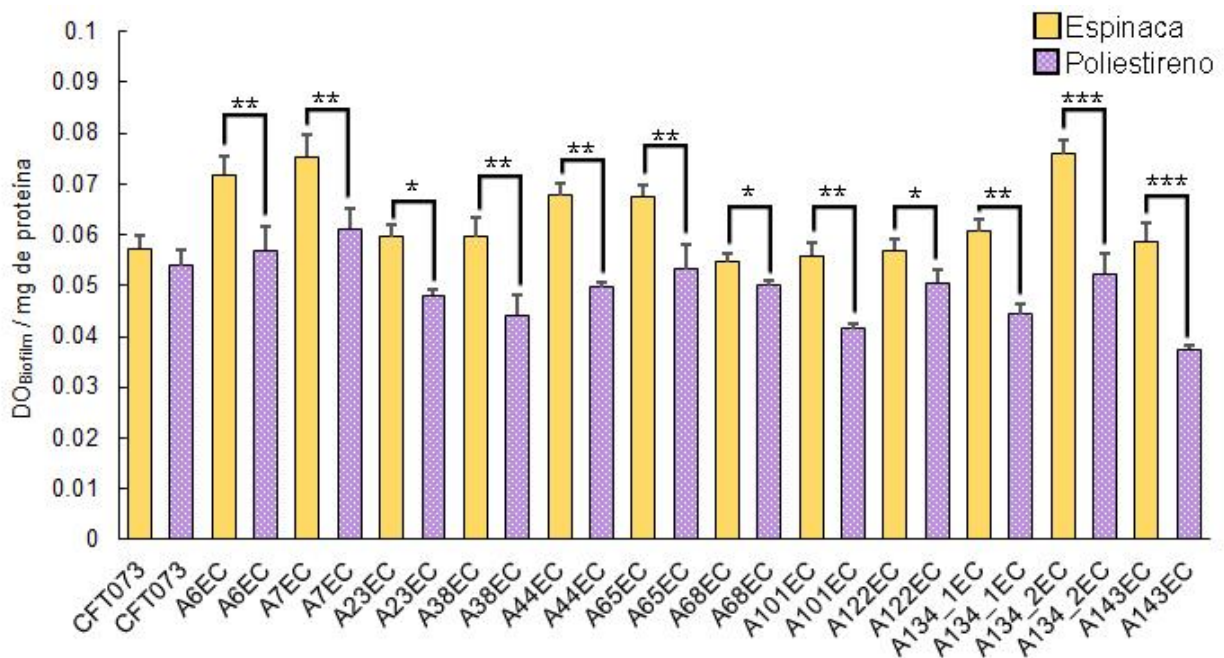


Figura 7.23 Comparación de la producción de biopelícula en superficie de poliestireno y superficie de la hoja de espinaca a 37°C por 24 horas.

7.6.2 Análisis bioinformático de genes asociados a la producción de biopelícula.

De los 46 genes asociados a la formación de biopelícula el 50% (23/46) estuvieron presentes en todas las cepas, principalmente los relacionados con formación de homopolisacárido lineal de β -1→4 y la regulación de la señalización. Todas las cepas(exceptuando A6EC, A7EC, A38EC y A65EC poseen los genes asociados a la

formación de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) que actúa como adhesina para el mantenimiento de la estabilidad estructural de la biopelícula (Itoh et al., 2008).

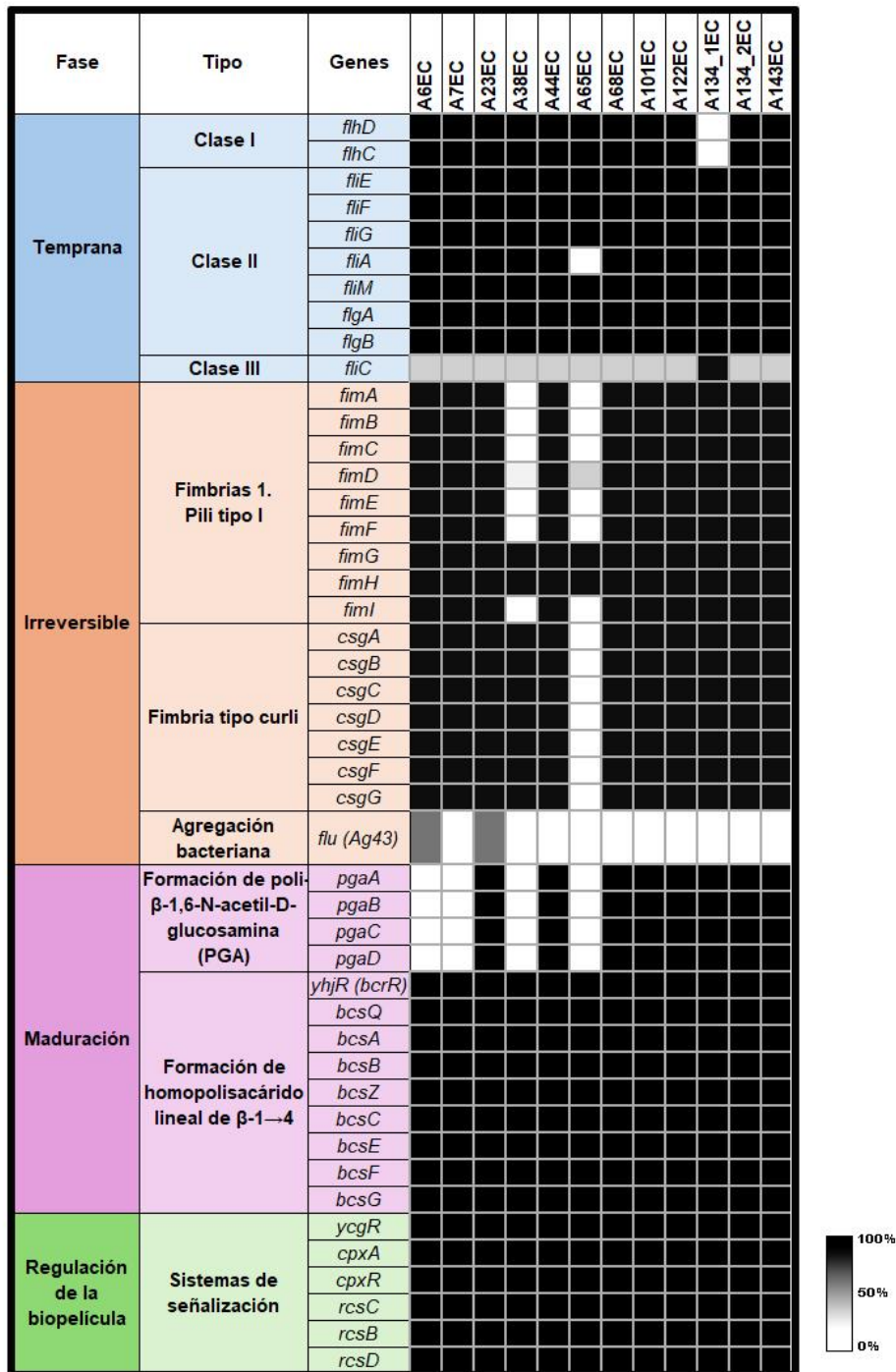


Figura 7.24 Genes de *E. coli* involucrados en la formación de una biopelícula. Se muestra la presencia de los genes involucrados en las cuatro etapas de la formación de biopelícula. Etapa temprana se encuentra en azul involucrando 10 genes, la etapa irreversible en color rojo se analizaron 17 genes, en la etapa de maduración (morado) se investigó la presencia de 13 genes y finalmente en la regulación de la

biopelícula se analizaron seis genes (verde). El área sombreada indica el porcentaje (%) de cobertura mostrada en el alineamiento con el gen de referencia.

De forma interesante al analizar los genes del operón *flhCD* que regulan la síntesis de los componentes estructurales y reguladores de la maquinaria flagelar (Fitzgerald et al., 2014) se encontraron presentes en todas las cepas, exceptuando a la cepa A134_1EC. Mientras tanto en los genes de la clase II, únicamente se mostró *fliA* ausente en la cepa A65EC. En el caso de *fliC* que codifica la subunidad básica que se polimeriza para formar el filamento flagelar rígido de *E. coli* (Nedeljković et al., 2021), se mostró presente en el 92% (11/12) de las cepas con $\leq 50\%$ de cobertura, excepto para la cepa A134_1EC (**Figura 7.24**). Por su parte, el gen *flu* (Ag43) se encontró ausente en el 83% (10/12) de las cepas, y en las dos restantes (A6EC y A23EC) se encontró con el 63% y 87% de cobertura, respectivamente.

7.7 Adherencia e invasión de *E. coli* de alimentos en células HeLa.

Finalmente se evaluó la capacidad de adherencia e invasión de las 12 cepas de *E. coli* aisladas de alimentos a células HeLa. Las cepas A68EC, A44EC y A23EC, presentaron los mayores niveles de adherencia con 17.6, 16.7 y 13.3 bacterias por célula, respectivamente. Además, se mostraron 14 veces más adherentes que la cepa control UPEC (CFT073) ($p < 0.001$) y se describieron con una adherencia similar a la cepa C7223 reportada por Barrios-Villa en 2020 como hiperadherente (Barrios-Villa et al., 2020). De las cepas restantes, tres (A7EC, A65EC, A134_1EC) aunque en menor proporción también presentaron una adherencia superior a la cepa control UPEC ($p < 0.01$). El patrón de adherencia más prevalente fue el agregativo, presente en las cepas A68EC, A44EC y A23EC que mostraron una franca capacidad superior de adherencia, mientras que el resto presentó patrón de ladrillos en una sola línea o difuso (**Figura 7.25**).

En el caso de la cepa A23EC que se describió en el **apartado 7.3** la definimos como una bacteria potencialmente uropatógena debido a que se identificaron islas de patogenicidad y genes de virulencia asociados a este patotipo, resaltando la presencia de distintos tipos de fimbrias y adhesinas; por lo que el ensayo de adherencia sobre

células HeLa parece confirmar esta hipótesis, ya que se conoce que las adhesinas presentes en UPEC cumplen un papel muy importante al permitir su unión con las células del tracto urinario evitando de esta forma su eliminación mediante el flujo de orina (Mulvey, 2002).

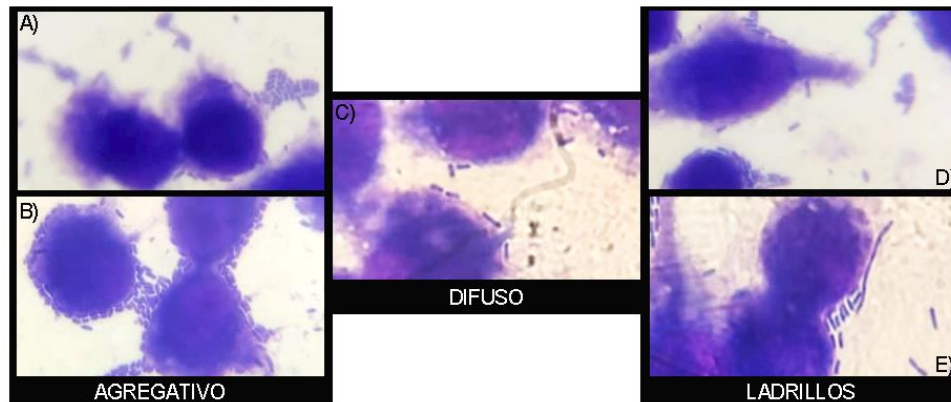


Figura 7.25 Patrones de adherencia de *E. coli* a células HeLa. Microscopia de campo claro objetivo 100x. Tinción de Giemsa. A y B: Patrón de adherencia agregativo, se muestran las cepas A44EC y A23EC, respectivamente C: Patrón de adherencia difuso, se muestra la cepa A7EC C y D: Patrón de adherencia de ladrillos, se muestran las cepas A65EC, A134_1EC, respectivamente.

Por otra parte, en los ensayos de invasión la cepa que mostró mayor capacidad de invasión (~ 3 veces más) fue la cepa A68EC aislada de una muestra de cebolla/cilantro, seguida de las cepas A38EC y A134_2EC, recuperadas de tomate y cilantro respectivamente; el resto de las cepas, aunque no mostraron diferencias significativas si tuvieron valores superiores al control a excepción de la cepa A23EC y A65EC (**Figura 7.26**).

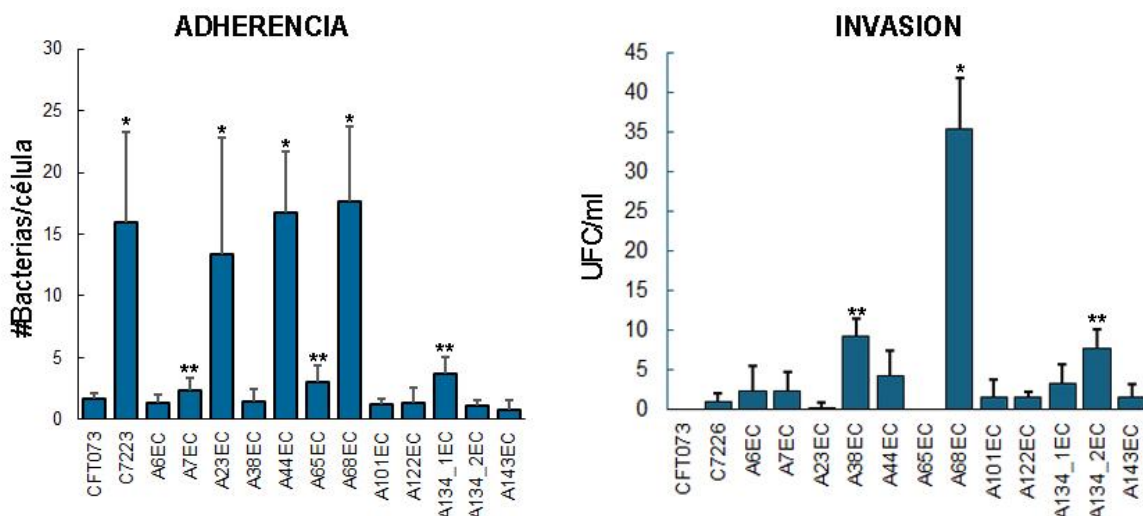


Figura 7.26. Capacidad de adherencia e invasión en células HeLa de las cepas de *E. coli*, aisladas de alimentos. El número de bacterias adheridas representa el promedio de tres experimentos independientes por triplicado. * indica 0.01 y ** indica 0.001.

DISCUSIÓN

Estos resultados son interesantes ya que de acuerdo con otros estudios se esperaba que las 12 cepas mostraran un comportamiento en la formación de biopelícula relacionado positivamente con la temperatura, es decir, que a mayores temperaturas la producción en todos los casos fuera más rápida y por lo tanto más abundante (Díaz-Villanueva et al., 2011), de igual forma se esperaba que un mayor tiempo de incubación permitiera el incremento del contenido de biopelícula proporcional en todas las cepas (Uhlich et al., 2014); sin embargo, los resultados en este estudio pueden explicarse dada la variabilidad de cada cepa, el agotamiento diferencial de los nutrientes y la acumulación de metabolitos debido al aumento acelerado de la biomasa, la diversidad de estructuras sintetizadas, el número de plásmidos y otros factores biológicos que pudieran condicionar la disponibilidad y utilización de nutrientes en cada caso (Ryu et al., 2004; Skyberg et al., 2007; Toyofuku et al., 2016; Vogeleeer et al., 2016). Estudios anteriores contrastan con los resultados en este trabajo, por ejemplo, Ma y colaboradores reportan una mayor producción de biopelículas a 22°C durante 24 horas en cepas STEC aisladas de muestras cárnicas y clínicas sobre acero inoxidable (Ma et al., 2019), similar a Rodrigues y su equipo los cuales muestran cepas APEC recuperadas de muestras de aves productoras de biopelícula a 25°C con concentraciones de celulosa mayores que

sus pares en un medio de cultivo con baja concentración de nutrientes (Rodrigues et al., 2019). Mientras que Mathlouthi y colaboradores muestran la influencia de otros factores ambientales como el pH en cepas de *E. coli* de origen clínico en medio LB a pH de 7.4 que favoreció el desarrollo de biopelícula a 25°C, mientras que a 37°C no fue detectable (Mathlouthi et al., 2018).

Por otra parte, los resultados mediante el análisis bioinformático muestran una carencia de los genes asociados a la síntesis del flagelo, aunque presentan niveles similares de producción de biopelícula entre las cepas que los albergan y las que carecen de ellos, esto pareciera indicar que la movilidad no tiene un impacto importante por lo menos en las cepas analizadas. Particularmente, para la ausencia del gen *fliC*, coincide con lo reportando por Vilas-Boas en 2024, en la que observan en *E. coli* que la mutación $\Delta fliC$ genera un retraso en su adhesión celular; sin embargo, después de superar este retraso alcanza los mismos niveles de producción de biopelícula por la cepa nativa (Vilas Boas et al., 2024); sin embargo, de manera interesante esto contrasta con otros estudios usando patotipos como ETEC (Zhou et al., 2014), EHEC (Nagy et al., 2015) y UPEC (Dusane et al., 2014; Hung et al., 2013) en los cuales la producción de biopelícula disminuye hasta el 50% cuando se realiza la delección de *fliC* o *flhDC*.

Por otra parte, la cepa A65EC muestra los niveles más bajos de la producción de biopelícula, aproximadamente del 50% independientemente del tiempo y temperatura a la que fue incubada, por su parte el análisis bioinformático de esta cepa mostró la ausencia de *fim* y *csg*; en esto coincidió reportes donde solo la falta de fimbrias de este tipo fue responsable de la reducción en más del 45% en la formación de biopelículas cuando fueron cuantificadas mediante cristal violeta (Besharova et al., 2016). Así mismo, a pesar de conocerse que *csgAB* se expresan predominantemente a temperatura ambiente (Prigent-Combaret et al., 2000), no se mostró ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las incubadas a 20°C y 37°C bajo las condiciones.

Respecto al análisis de Ag43, estudios anteriores indicaron que este factor media la autoagregación de ciertas cepas de *E. coli*, lo que pareciera indicar que es un elemento determinante en la maduración y estructuración de la biopelícula (Öztürk et al., 2023); sin embargo, en este estudio no parece tener un efecto determinante en la cuantificación

final, esto podría asociarse con un crecimiento diferencial ya que se ha observado que Ag43 parece prescindible en medios de cultivo como LB y BHI en cepas comensales o asociadas con alimentos (Danese et al., 2000; Fang et al., 2022). En contraste, la presencia de Ag43 en la cepa A23EC, pareciera reforzar nuevamente la idea de su potencial uropatogénico ya que otros estudios catalogan a esta proteína con propiedades autoagregativas de alto nivel que ayuda a la persistencia en la vejiga urinaria (Lüthje & Brauner, 2010). Este comportamiento ambivalente parece resaltar la importancia de estudiar cepas de diferente origen y observar si esto genera o no diferentes patrones específicos de formación de biopelículas, agregación y adherencia en presencia o ausencia de Ag43.

Mientras tanto, la cepa A65EC y A68EC pareciera condicionar su menor adhesión y formación biopelícula a la carencia de elementos del curli (*csg*) en las superficies vegetales, ya que como se ha descrito que estas fimbrias del curli tienen un papel importante en la interacción *in vivo* entre la bacteria y las superficie (Cangui-Panchi et al., 2023; Gophna et al., 2001); sin embargo, cuando se analizó la capacidad de las cepas A65EC y A68EC MDR mostró una elevada capacidad para adherirse e invadir en células humanas; esto resulta muy importante, ya que en los apartados anteriores se describen como cepas MDR y productoras de BLEE, portadoras de al menos un plásmido IncF. Además, pertenecen a los ST410 y ST746 descritos como un clon mundialmente emergente de alto riesgo al presentar resistencia acumulada a múltiples fármacos y más recientemente al relacionarse con la producción de carbapenemasas particularmente *bla*_{NDM} (Ju et al., 2023; Peirano et al., 2018; Zhang et al., 2017).

Esto sugiere que el consumo de alimentos contaminados por este tipo de cepas pueden comprometer seriamente la salud del consumidor bajo condiciones de susceptibilidad y que al no poseer elementos que le mantengan en la superficie del vegetal con un lavado eficiente podrían fácilmente eliminarse; mostrando que en ese sentido, que los protocolos de descontaminación en alimentos frescos no resultan ineficientes sino inexistentes; aunque; la formación de la biopelícula en los vegetales puede reducir la eficacia antimicrobiana de tecnologías y procedimientos como la irradiación uv (Wright et al., 2017), desinfectantes (Nakamura et al., 2013; Sanchez-Vizueté et al., 2015), pH

extremos (Hošťacká et al., 2010), alta salinidad y disminución de nutrientes (Yin et al., 2019).

De manera global estos hallazgos resaltan que condiciones ambientales como la temperatura, la superficie de contacto y el tiempo de incubación pueden promover la formación de biopelículas en las diferentes instalaciones de transporte, almacenamiento y comercialización de los productos frescos. Además, se ha descrito en múltiples estudios que una vez que *E. coli* formadora de biopelícula contamina un equipo, los procedimientos de desinfección en el procesamiento de alimentos actuales pueden no ser eficientes para eliminar a la biopelícula (Fernández-Gómez et al., 2022; X. Liu et al., 2023; F. Zhou et al., 2022).

También, observamos que las cepas A38EC, A68EC y A134_1EC, muestran una mayor capacidad de invasión; en 2023, dos Santos y colaboradores, reportaron el aislamiento de ocho de *E. coli* recuperadas de bivalvos comestibles de las cuales dos caracterizadas como ExPEC mostraron la capacidad de invadir células HeLa (Bueris et al., 2022). Así mismo, en 2024 Lee y su equipo, analizaron 22 cepas híbridas STEC/aEPEC provenientes de carne de cerdo y res fueron sometidas a ensayos de invasión, cinco de estas cepas fueron descritas como altamente invasivas para las células HeLa en comparación con la cepa control del patotipo EPEC (E2348/69) (Lee et al., 2024). Generalmente, algunos de los patotipos de *E. coli* poseen la capacidad de invadir células y tejidos en el hospedero permitiendo evadir las defensas del hospedero y propagarse fácilmente; curiosamente, las cepas tres cepas de este estudio (A38EC, A68EC y A134_1EC) con una capacidad de invasión alta, no fueron determinadas como algún patotipo de *E. coli* y no se determinó la presencia de algún gen que codificara invasinas de *E. coli* conocidas. Además, hasta donde se tiene conocimiento este es el primer reporte de *E. coli* recuperadas de vegetales que tienen la capacidad de invadir celular HeLa.

Finalmente los resultados muestran que las cepas aisladas de alimentos frescos, no sólo cuentan con elementos genéticos de virulencia y resistencia a antimicrobianos capaces de ser movilizados a través de plásmidos conjugativos, transposones e integrones, sino también poseen herramientas que les pueden permitir persistir en superficies inertes a

temperaturas de almacenamiento convencional llegando a otros alimentos a través de la contaminación cruzada; así como, el adherirse e invadir células humanas después de ser consumida.

8. CONCLUSIONES

De los 1794 genomas de *E. coli* identificados en bases de datos públicas (BDP), la mayoría (649) provenían de origen clínico y sólo 77 fueron de origen alimentario, esto muestra una evidente carencia de información respecto a la representación de genomas de *E. coli* provenientes de alimentos para realizar análisis epidemiológicos más robustos.

La comparación filogenética incluidos filogrupos y secuenciotipos en ambos conjuntos de genomas en BDP sugiere que las cepas se intercambian entre ambos ambientes con menor frecuencia de la esperada.

Ambos grupos de genomas, clínicos y alimentarios presentaron plásmidos de tamaños y características similares; entre ellas la presencia de genes de virulencia (72 genes) y resistencia a antibióticos (175 genes); de los cuales, solo 5 y 11, respectivamente se encontraron de manera exclusiva en plásmidos de origen alimentario. Además, 2/3 de los plásmidos en ambos grupos que contenían genes de virulencia y/o resistencia tenían la capacidad de movilizarse.

La combinación PTU/Inc permitió mejorar la especificidad del análisis de coocurrencia, mostrando 8 combinación con los puntajes más altos PTU-B/O/K/Z IncB/O/K/Z, PTU-HI2 IncHIA, Non-PTU ColRNAI, PTU-E69 IncB/O/K/Z, PTU-HI2 IncHI2A, PTU-FE F:-:A:-B1, PTU-E41 F:-:A:-B15 y PTU-E5 F23:A:-B3, correlacionados con la presencia de genes de virulencia o resistencia a antibióticos o ambos. Lo que parece indicar que estos son los plásmidos presentes en ambos grupos que podrían dirigir la movilización de genes entre ambos nichos.

El análisis bioinformático de 12 cepas de *E. coli* aisladas a partir de vegetales comercializados en la ciudad de Puebla mostró que todas poseían al menos siete genes de resistencia a antibióticos, seis genes de virulencia y portaban al menos un plásmido conjugativo. Resaltando la importancia del muestreo de cepas no clínicas.

Los filogrupos a los cuales pertenecieron las 12 cepas de *E. coli* fueron A (5), B1 (3), C (3) y B2 (1). Mientras que los ST más prevalentes fueron ST155 (2), ST746 (2) y ST5019 (2); vinculados frecuentemente con aislados ambientales siendo congruente con el

origen de aislamiento y reforzando la sugerencia que no hay una frecuencia elevada de cepas entre el ambiente clínico y el ambiental.

La cepa A23EC que perteneció al filogrupo B2 y al ST131 un clon epidémico multidrogoresistente, fue caracterizada como una cepa ExPEC, UPEC y MDR. Además, mostró la presencia del TnMB1860 estructurado por *aac(3)-Ile*, *tmrB*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA1}*, Δ *catB3*, *bla_{CXT-M-15}*, *wbuC* y flanqueado por IS26. Mediante este elemento fue caracterizado dentro del clado emergente C2b al igual que 18 cepas previamente reportadas en las bases de datos públicas.

El plásmido pA23EC mostró características genéticas de conjugación y fue sometido a ensayos de conjugación *in vitro* a 37°C y 20°C. Esto indica la aparición de cepas de importancia clínica adaptadas en ambientes alimentarios, además, la generación de transconjugantes resultantes confirma la posibilidad de la transferencia a temperaturas de almacenamiento y/o comercialización de vegetales.

Las cepas A65EC y A134EC fueron determinadas como productoras de betalactamasas tipo ampC. El gen *bla_{CMY-2}* fue reportado en una estructura *ISEcp1-tnpA-blc-sugE* que a su vez era acarreada por plásmidos IncI (móvil) y p0111 (no móvil), respectivamente; sugiriendo una transferencia tanto vertical como horizontal a través de conjugación y de transposición dentro de la misma célula. Además, este es el primer reporte de este *bla_{CMY-2}* en cepas aisladas de vegetales.

Este estudio mostró por primera vez la presencia de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales que portaban en un plásmido al gen *fosA* asociado con la resistencia a fosfomicina. De igual forma, este es el primer informe de la variante *fosA2* y *fosA7.5* acarreadas por plásmidos en cepas provenientes de alimentos; sin embargo, no se estableció un entorno genético definido en todas las cepas. Lo que resalta la necesidad de un análisis adicional que permita establecer patrones de la presencia de estos genes y sus entornos en cepas de origen clínico y no clínico.

Por su parte, sólo dos cepas (A6EC y A7EC) mostraron una similar producción de biopelícula que el control (CFT073) a 20°C por 24 horas, este número aumentó a ocho cepas (A6EC, A7EC, A38EC, A44EC, A65EC, A68EC, A101EC, A122EC, A134_1EC,

A134_2EC y A143EC) después de 24 horas adicionales (total 48 horas). Cuando se sometió a una incubación de 37°C por 24 horas, todas mostraron una producción mayor que cuando se incubaron a 20°C. Lo que indica que las condiciones de incubación (tiempo y temperatura) condicionan el comportamiento de las cepas de *E. coli*.

Finalmente los resultados muestran que las cepas aisladas de alimentos frescos, no sólo cuentan con elementos genéticos de virulencia y resistencia a antimicrobianos capaces de ser movilizados a través de plásmidos conjugativos, transposones e integrones, sino también poseen herramientas que les pueden permitir persistir en superficies inertes (biopelícula) a temperaturas de almacenamiento convencional llegando a otros alimentos a través de la contaminación cruzada; así como, el adherirse e invadir células humanas después de ser consumida.

9. PERSPECTIVAS

1. Caracterizar mediante otros elementos (tamaño, iterones, sistemas de adición y sistemas de partición) a los plásmidos no tipificables de la base de datos creada para el estudio bioinformático inicial; esto permitirá clasificar a estos plásmidos, así como investigar a profundidad su contribución a la movilización de determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos.
2. Realizar la caracterización de plásmidos provenientes de origen veterinario, ríos, lagos y aguas residuales. Esto permitiría tener una mejor comprensión del plasmidoma de *E. coli*. Posteriormente se determinaría la filogenia de las cepas y de los plásmidos contenidos, con lo que podríamos entender cómo se dirige el intercambio genético en esta especie bacteriana.
3. Someter la cepa A23EC a ensayos de patogenicidad en modelos *in vivo*, como *G. mellonella* o ratones (*Mus musculus*).
4. Caracterizar mediante PFGE+S1 y secuenciación del genoma completo la integridad del plásmido pA23EC transferido a las transconjugantes; para determinar si la movilización del plásmido es total.
5. Evaluar mediante ensayos de transformación la funcionalidad del transposón compuesto TnMB1860 para generar resistencia a carbapenemasas y esclarecer la funcionalidad de $\Delta catB3$ en el contexto del mismo transposón.
6. Realizar ensayos de conjugación para las 11 cepas restantes obtenidas de productos frescos, considerando variaciones de tiempo, concentración de nutrientes, cepas receptoras y temperatura.
7. Establecer la relación filogenética de las cepas productoras de *bla*_{CMY-2} en el contexto de los genomas pertenecientes a ST746 y ST10 depositados en las bases de datos públicas.
8. Evaluar mediante retos a antimicrobianos la sobrevivencia de las cepas A65Ec y A134_1EC portadoras de *sugE* frente a desinfectantes de sales de amonio cuaternario acarreadas por las cepas A65EC y A134_1EC.

9. Realizar una búsqueda de los genes *fosA2*, *fosA3* y *fosA7.5* en genomas s de *E. coli* con el fin de comparar los entornos genéticos y establecer si hay EGM específicos ligados a cada una de las variantes de estos genes que les permiten movilizarse.

10. Realizar ensayos de formación de biopelícula de cepas de *E. coli* aisladas de alimentos sobre superficies como cerámica, vidrio, plástico y acero inoxidable; esto permitirá determinar el riesgo de transferencia de genes de virulencia y/o resistencia desde estos materiales a alimentos de consumo humano y/o animal directo

10. REFERENCIAS

- Aeksiri, N., Toanan, W., Sawikan, S., Suwannarit, R., Pungpomin, P., Khieokhajokhet, A., & Niumsup, P. R. (2019). First detection and genomic insight into mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistance gene in *Escherichia coli* ST101 isolated from the migratory bird species *hirundo rustica* in Thailand. *Microbial Drug Resistance*, 25(10), 1437–1442. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0020>
- Aghamali, M., Sedighi, M., Bialvaei, A. Z., Mohammadzadeh, N., Abbasian, S., Ghafouri, Z., & Kouhsari, E. (2019). Fosfomycin: Mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 11–25. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000874>
- Ahmed, M. A. E.-G. E.-S., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., & Tian, G.-B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Aiyedun, B., Onarinde, M., Swainson, M., & Dixon, R. A. (2020). Foodborne Outbreaks of Microbial Infection from Fresh Produce in Europe And North America: A Systematic Review of Data from This Millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 2215–2223. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14884>
- Ali, A., Fontana, H., Sano, E., Li, R., Humayon, M., Rahman, S., Lincopan, N., & Mohsin, M. (2021). Genomic features of a high-risk mcr-1.1-positive *Escherichia coli* ST10 isolated from cattle farm environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(38), 54147–54152. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15437-6>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of b-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 331, 153–178. <https://doi.org/10.1090/gsm/146/03>
- Ambudkar, S. V., Anantharam, V., & Maloney, P. C. (1990). UhpT, the sugar phosphate antiporter of *Escherichia coli*, functions as a monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), 12287–12292. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38343-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38343-7)
- Anandan, A., & Vrielink, A. (2020). Structure and function of lipid A-modifying enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 19–37. <https://doi.org/10.1111/nyas.14244>
- Anjum, M. F., Schmitt, H., Börjesson, S., Berendonk, T. U., Donner, E., Stehling, E. G., Boerlin, P., Topp, E., Jardine, C., Li, X., Li, B., Dolejska, M., Madec, J. Y., Dagot, C., Guenther, S., Walsh, F., Villa, L., Veldman, K., Sunde, M., Pedersen, K. (2021). The potential of using *E. coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.011>
- Anyanwu, M. U., Marrollo, R., Paolucci, M., Brovarone, F., Nardini, P., Chah, K. F.,

- Shoyinka, S. V. O., & Carretto, E. (2021). Isolation and characterisation of colistin-resistant Enterobacterales from chickens in Southeast Nigeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.04.030>
- Anyanwu, Madubuike Umunna, Jaja, I. F., & Nwobi, O. C. (2020). Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031028>
- Arimizu, Y., Kirino, Y., Sato, M. P., Uno, K., Sato, T., Gotoh, Y., Auvray, F., Brugere, H., Oswald, E., Mainil, J. G., Anklam, K. S., Döpfer, D., Yoshino, S., Ooka, T., Tanizawa, Y., Nakamura, Y., Iguchi, A., Morita-Ishihara, T., Ohnishi, M., Ogura, Y. (2019). Large-scale genome analysis of bovine commensal *Escherichia coli* reveals that bovine-adapted *E. coli* lineages are serving as evolutionary sources of the emergence of human intestinal pathogenic strains. *Genome Research*, 29(9), 1495–1505. <https://doi.org/10.1101/gr.249268.119>
- Assefa, M. (2022). Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections : A Review. August, 5061–5068.
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), 905–917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>
- Balali, G. I., Yar, D. D., Afua Dela, V. G., & Adjei-Kusi, P. (2020). Microbial Contamination, an Increasing Threat to the Consumption of Fresh Fruits and Vegetables in Today's World. *International journal of microbiology*, 2020, 3029295. <https://doi.org/10.1155/2020/3029295>
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zaraín, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez De La Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2018a). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0295-4>
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano Zarain, P., Romero-Romero, S., Lara Flores, N., Estepa, V., Somalo, S., Torres, C., & Rocha-Gracia, R. del C. (2018b). Characterization of extended-spectrum and CMY-2 β -lactamases, and associated virulence genes in *Escherichia coli* from food of animal origin in México. *British Food Journal*, 120(7), 1457–1473. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2018-0104>
- Barrios-Villa, E., Martínez de la Peña, C. F., Lozano-Zaraín, P., Cevallos, M. A., Torres, C., Torres, A. G., & Rocha-Gracia, R. del C. (2020). Comparative genomics of a subset of Adherent/Invasive *Escherichia coli* strains isolated from individuals without inflammatory bowel disease. *Genomics*, 112(2), 1813–1820.

<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.10.013>

- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., & Giacobbe, D. R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Medicine*, 6(April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00074>
- Baxter, J. C., & Funnell, B. E. (2015). Plasmid Partition Mechanisms. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 133–155. <https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch8>
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H. Le, Denamur, E., & Clermont, O. (2018). ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia* genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7), e000192. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002>
- Belotserkovsky, I., Sansonetti, P. J., Jenkins, C., Slater, S. L., Sagfors, A. M., Pollard, D. J., Ruano-Gallego, D., Frankel, G., Shenoy, A. R., Furniss, R. C. D., Goddard, P. J., Clements, A., Yair, Y., Gophna, U., Paitan, Y., Nesta, B., & Pizza, M. (2018). *Escherichia coli*, a versatile pathogen. In *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (Vol. 416, Issue 1). <http://www.springer.com/series/82>
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W30–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
- Bertonha, A. F., Silva, C. C. L., Shirakawa, K. T., Trindade, D. M., & Dessen, A. (2023). Penicillin-binding protein (PBP) inhibitor development: A 10-year chemical perspective. *Experimental Biology and Medicine*, 248(19), 1657–1670. <https://doi.org/10.1177/15353702231208407>
- Besharova, O., Suchanek, V. M., Hartmann, R., Drescher, K., & Sourjik, V. (2016). Diversification of gene expression during formation of static submerged biofilms by *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01568>
- Bhat, B. A., Mir, R. A., Qadri, H., Dhiman, R., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2023). Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1231938>
- Bhatta, D. R., Hamal, D., Shrestha, R., Hosuru Subramanya, S., Baral, N., Singh, R. K., Nayak, N., & Gokhale, S. (2018). Bacterial contamination of frequently touched objects in a tertiary care hospital of Pokhara, Nepal: How safe are our hands? *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0385-2>
- Biggel, M., Moons, P., Nguyen, M. N., Goossens, H., & Van Puyvelde, S. (2022).

- Convergence of virulence and antimicrobial resistance in increasingly prevalent *Escherichia coli* ST131 papGII+ sublineages. *Communications Biology*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03660-x>
- Biggel, M., Xavier, B. B., Johnson, J. R., Nielsen, K. L., Frimodt-Møller, N., Matheeussen, V., Goossens, H., Moons, P., & Van Puyvelde, S. (2020). Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19714-9>
- Bissonnette, L., & Roy, P. H. (1992). Characterization of Inc of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174(4), 1248–1257. <https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1248-1257.1992>
- Blot, M. (1994). Transposable elements and adaptation of host bacteria. *Genetica*, 93(1–3), 5–12. <https://doi.org/10.1007/BF01435235>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 2015(4), 1–12. <https://doi.org/10.7554/elife.05826>
- Böhning, J., Tarafder, A. K., & Bharat, T. A. M. (2024). The role of filamentous matrix molecules in shaping the architecture and emergent properties of bacterial biofilms. *Biochemical Journal*, 481(4), 245–263. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210301>
- Bondi, R., Chiani, P., Michelacci, V., Minelli, F., Caprioli, A., & Morabito, S. (2017). The Gene *tia*, Harbored by the Subtilase- Encoding Pathogenicity Island, Is Involved in the Ability of Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains To Invade Monolayers of Epithelial Cells. *American Journal of Epidemiology*, 85(12), 1–7. <https://doi.org/DOI: 10.1128/IAI.00613-17>
- Bonnet, R., Beyrouthy, R., Haenni, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Dalmasso, G., & Madec, J. Y. (2021). Host colonization as a major evolutionary force favoring the diversity and the emergence of the worldwide multidrug-resistant *Escherichia coli* st131. *MBio*, 12(4), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01451-21>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Brovedan, M. A., Cameranesi, M. M., Limansky, A. S., Morán-Barrio, J., Marchiaro, P., & Repizo, G. D. (2020). What do we know about plasmids carried by members of the *Acinetobacter* genus? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02890-7>
- Bueris V, Sellera FP, Fuga B, Sano E, Carvalho MPN, Couto SCF, Moura Q, Lincopan N. Convergence of virulence and resistance in international clones of WHO critical priority enterobacteriales isolated from Marine Bivalves. *Sci Rep*. 2022 Apr

5;12(1):5707. doi: 10.1038/s41598-022-09598-8

- Bugg, T. D. H., & Kerr, R. V. (2019). Mechanism of action of nucleoside antibacterial natural product antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 72(12), 865–876. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0227-3>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). Bush and Bradford - 2016 - β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors An Overview.pdf. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, Table 1, 22.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Callejón, R. M., Rodri, M. I., Ubeda, C., Hornedo-ortega, R., Garcia-parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union : Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(1), 32–38. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1821>
- Campanacci, V., Bishop, R. E., Blangy, S., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2006). The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Letters*, 580(20), 4877–4883. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.086>
- Candel, F. J., Matesanz David, M., & Barberán, J. (2019). New perspectives for reassessing fosfomycin: applicability in current clinical practice. *Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 32, 1–7.
- Cangui-Panchi, S. P., Ñacato-Toapanta, A. L., Enríquez-Martínez, L. J., Salinas-Delgado, G. A., Reyes, J., Garzon-Chavez, D., & Machado, A. (2023). Battle royale: Immune response on biofilms – host-pathogen interactions. *Current Research in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2023.100057>
- Cao, C., Zhao, W., Lü, Z., Mo, Y., Hu, W., Sun, S., Cheng, H., Ma, J., Xiong, S., Jin, X., Yang, H., Bai, L., Cui, S., & Yang, B. (2023). Microbiological analysis and characterization of Salmonella and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates recovered from retail fresh vegetables in Shaanxi Province, China. *International Journal of Food Microbiology*, 387(June 2022), 110053. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110053>
- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R., & Grütter, M. G. (2006). Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, 8(8), 2284–2290. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.013>
- 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), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>
- Carattoli, A., Villa, L., Fortini, D., & García-Fernández, A. (2018). Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in

Enterobacteriaceae. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.12.001>

- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Carloni, E., Andreoni, F., Omiccioli, E., Villa, L., Magnani, M., & Carattoli, A. (2017). Comparative analysis of the standard PCR-Based Replicon Typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. *Plasmid*, 90, 10–14. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2017.01.005>
- Carreón-León, E. A. (2019). Estudio molecular de la resistencia y virulencia de Cepas de *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de vegetales crudos [Benemerita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4692>
- Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics*, 2(2), 217–236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-Garcia, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2), 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025>
- CDC. (2018). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015. https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/ss/ss6710a1.htm?s_cid=ss6710a1_w
- CDC. (2023). Outbreaks CDC. <https://www.cdc.gov/outbreaks>
- Cerna-Cortes, J. F., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Ramírez-Cruz, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Presence of indicator bacteria, Salmonella and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes on mung bean sprouts from public markets in Pachuca, Mexico. *Food Control*, 31(2), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.010>
- Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., & Rolain, J. M. (2022). Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080988>
- Chen, Li, C., Ge, H., Qiao, J., Fang, L., Liu, C., Gou, J., & Guo, X. (2024). Difference analysis and characteristics of incompatibility group plasmid replicons in gram-negative bacteria with different antimicrobial phenotypes in Henan, China. *BMC Microbiology*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03212-9>
- Chen, Y. J., Rao, S. D., & Seelig, G. (2015). Plasmid-derived DNA strand displacement gates for implementing chemical reaction networks. *Journal of Visualized*

Experiments, 2015(105), 1–17. <https://doi.org/10.3791/53087>

- Chiu, C. H., Lee, J. J., Wang, M. H., & Chu, C. (2021). Genetic analysis and plasmid-mediated blaCMY-2 in *Salmonella* and *Shigella* and the Ceftriaxone Susceptibility regulated by the ISEcp-1 tnpA-blaCMY-2-blc-sugE. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(4), 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.01.008>
- CLSI. (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 32nd Edition: M100.
- Coelho, A., González-López, J. J., Miró, E., Alonso-Tarrés, C., Mirelis, B., Larrosa, M. N., Bartolomé, R. M., Andreu, A., Navarro, F., Johnson, J. R., & Prats, G. (2010). Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: Plasmid diversity and chromosomal integration. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.03.005>
- Coluzzi, C., Garcillán-Barcia, M. P., De La Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2022). Evolution of Plasmid Mobility: Origin and Fate of Conjugative and Nonconjugative Plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac115>
- Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Torres, C., Castañeda, M., Sánchez, G. M., Alonso, C. A., López-Pliego, L., Mayen, M. G. G., Martínez-Laguna, Y., & Rocha-Gracia, R. (2016). Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Producers of Extended-Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases, Isolated from Turtles in Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(9), 595–603. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1725>
- Cuénod, A., Agnetti, J., Seth-Smith, H. M. B., Roloff, T., Wälchli, D., Shcherbakov, D., Akbergenov, R., Tschudin-Sutter, S., Bassetti, S., Siegemund, M., Nickel, C. H., Moran-Gilad, J., Keys, T. G., Pflüger, V., Thomson, N. R., & Egli, A. (2023). Bacterial genome-wide association study substantiates papGII of *Escherichia coli* as a major risk factor for urosepsis. *Genome Medicine*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01243-x>
- Cummins, E. A., Hall, R. J., Connor, C., McInerney, J. O., & McNally, A. (2022). Distinct evolutionary trajectories in the *Escherichia coli* pangenome occur within sequence types. *Microbial Genomics*, 8(11), 1–13. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000903>
- Cunha, M. P., Lincopan, N., Cerdeira, L., Esposito, F., Dropa, M., Franco, L. S., Moreno, A. M., & Knöbl, T. (2017). Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Poultry in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4), e02474-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02474-16>
- Ćwiek, K., Korzekwa, K., Tabiś, A., Bania, J., Bugla-Płoskońska, G., & Wieliczko, A. (2020). Antimicrobial resistance and biofilm formation capacity of *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains isolated from poultry and humans in Poland. *Pathogens*, 9(8), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080643>

- Ćwiek, K., Woźniak-Biel, A., Karwańska, M., Siedlecka, M., Lammens, C., Rebelo, A. R., Hendriksen, R. S., Kuczkowski, M., Chmielewska-Władyka, M., & Wieliczko, A. (2021). Phenotypic and genotypic characterization of mcr-1-positive multidrug-resistant *Escherichia coli* ST93, ST117, ST156, ST10, and ST744 isolated from poultry in Poland. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1597–1609. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00538-8>
- da Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 3(1), 18–28. <https://doi.org/10.4161/viru.3.1.18382>
- Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>
- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L., & Kolter, R. (2000). The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37(2), 424–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02008.x>
- Datta, N., & Hedges, R. W. (1971). Compatibility groups among fi - R factors. *Nature*, 234(5326), 222–223. <https://doi.org/10.1038/234222a0>
- Davidova-Gerzova, L., Lausova, J., Sukkar, I., Nesporova, K., Nechutna, L., Vlkova, K., Chudejova, K., Krutova, M., Palkovicova, J., Kaspar, J., & Dolejska, M. (2023). Hospital and community wastewater as a source of multidrug-resistant ESBL-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1184081>
- Day, M. J., Hopkins, K. L., Wareham, D. W., Toleman, M. A., Elviss, N., Randall, L., Teale, C., Cleary, P., Wiuff, C., Doumith, M., Ellington, M. J., Woodford, N., & Livermore, D. M. (2019). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(12), 1325–1335. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30273-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30273-7)
- De Angelis, G., Giacomo, P. Del, Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- de Brito, F. A. E., de Freitas, A. P. P., & Nascimento, M. S. (2022). Multidrug-Resistant Biofilms (MDR): Main Mechanisms of Tolerance and Resistance in the Food Supply Chain. *Pathogens*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens11121416>
- De la Rosa, J. M. O., Nordmann, P., Zong, Z., & Poirel, L. (2022). Aliidiomarina shirensis as Possible Source of the Integron- and Plasmid-Mediated Fosfomycin Resistance Gene fosC2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3), 1–8. <https://doi.org/10.1128/aac.02227-21>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson,

- S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), 1–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- De Reuse, H., & Danchin, A. (1988). The ptsH, ptsI, and crr genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 3827–3837. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.3827-3837.1988>
- Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(1), 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. 11(September). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Díaz-Villanueva, V. D., Font, J., Schwartz, T., & Romani, A. M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: Acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling*, 27(1), 59–71. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>
- Dorado-García, A., Smid, J. H., Van Pelt, W., Bonten, M. J. M., Fluit, A. C., Van Den Bunt, G., Wagenaar, J. A., Hordijk, J., Dierikx, C. M., Veldman, K. T., De Koeijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lam, T. J. G. M., Velthuis, A. G., Heuvelink, A., Gonggrijp, M. A., Heederik, D. J. J. (2018). Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: A pooled analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 339–347. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx397>
- dos Santos, G. F., de Sousa, F. G., Beier, S. L., Mendes, A. C. R., & Leão, A. M. G. e. S. (2023). *Escherichia coli* O157:H7 strains in bovine carcasses and the impact on the animal production chain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(3), 2243–2251. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01034-x>
- Duan, Y., Gao, H., Zheng, L., Liu, S., Cao, Y., Zhu, S., Wu, Z., Ren, H., Mao, D., & Luo, Y. (2020a). Antibiotic Resistance and Virulence of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Vary According to Molecular Types. *Frontiers in Microbiology*, 11(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598305>.
- Duan Q, Wu W, Pang S, Pan Z, Zhang W, Zhu G. (2020b) Coimmunization with Two Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Fimbrial Multi-epitope Fusion Antigens Induces the Production of Neutralizing Antibodies against Five ETEC Fimbriae (F4, F5, F6, F18, and F41). *Appl Environ Microbiol*. 2020 Nov 24;86(24):e00217-20. doi:

10.1128/AEM.00217-20.

- Dusane, D. H., Hosseinidoust, Z., Asadishad, B., & Tufenkji, N. (2014). Alkaloids modulate motility, biofilm formation and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli*. PLoS ONE, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112093>
- El Hage, R., Losasso, C., Longo, A., Petrin, S., Ricci, A., Mathieu, F., Abi Khattar, Z., & El Rayess, Y. (2020). Whole-genome characterisation of TEM-1 and CMY-2 β -lactamase-producing *Salmonella* Kentucky ST198 in Lebanese broiler chain. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 23, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.11.002>
- Eschenburg, S., Priestman, M., & Schönbrunn, E. (2005). Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) is essential for product release. Journal of Biological Chemistry, 280(5), 3757–3763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411325200>
- Falagas, M. E., Athanasaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A., & Vardakas, K. Z. (2019). Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. International Journal of Antimicrobial Agents, 53(1), 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.013>
- Falagas, M. E., Vouloumanou, E. K., Samonis, G., & Vardakas, K. Z. (2016). Fosfomycin. American Society for Microbiology, 29(2), 321–347. <https://doi.org/10.1128/CMR.00068-15.Address>
- Fang, L. X., Li, X.-P., Li, L., Chen, M.-Y., Li, L.-L., Liao, X.-P., Liu, Y.-H., & Sun, J. (2018). ISEcp1 -mediated transposition of chromosome-borne bla CMY-2 into an endogenous ColE1-like plasmid in *Escherichia coli*. Infection and Drug Resistance, 995–1005. <https://doi.org/DOI: 10.2147/IDR.S159345>
- Fang, L. X., Sun, J., Li, L., Deng, H., Huang, T., Yang, Q. E., Li, X., Chen, M. Y., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2015). Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. International Journal of Antimicrobial Agents, 46(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.003>
- Fang, Y., Visvalingam, J., Zhang, P., & Yang, X. (2022). Biofilm formation by Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in monocultures and co-cultures with meat processing surface bacteria. Food Microbiology, 102(September 2021), 103902. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103902>
- FAO. (2021). The International Year of Fruits and Vegetables. The UN General Assembly Designated 2021 the International Year of Fruits and Vegetables (IYFV). <https://www.fao.org/fruits-vegetables-2021/en/>
- Fedorec, A. J. H., Ozdemir, T., Doshi, A., Ho, Y. K., Rosa, L., Rutter, J., Velazquez, O., Pinheiro, V. B., Danino, T., & Barnes, C. P. (2019). Two New Plasmid Post-segregational Killing Mechanisms for the Implementation of Synthetic Gene Networks in *Escherichia coli*. IScience, 14, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.03.019>

- Feng, Jie, Xiang, Q., Ma, J., Zhang, P., Li, K., Wu, K., Su, M., Li, R., Hurley, D., Bai, L., Wang, J., & Yang, Z. (2021). Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Cultured From Retail Meat Products, Patients, and Porcine Excrement in China. *Frontiers in Microbiology*, 12(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743468>
- Feng, Jun, Pan, M., Zhuang, Y., Luo, J., Chen, Y., Wu, Y., Fei, J., Zhu, Y., Xu, Z., Yuan, Z., Chen, M., Feng, J., Pan, M., Zhuang, Y., Luo, J., Chen, Y., Wu, Y., Fei, J., Zhu, Y., Chen, M. (2024). Genetic epidemiology and plasmid-mediated transmission of *mcr-1* by *Escherichia coli* ST155 from wastewater of long-term care facilities. *American Society for Microbiology*, 12(3), 1–14.
- Fernández-Gómez, P., Trigo, E., Alegría, Á., Santos, J. A., López, M., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2022). Biofilm formation ability and tolerance to food-associated stresses among ESBL-producing *Escherichia coli* strains from foods of animal origin and human patients. *Lwt*, 168(September). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113961>
- Finn, T. J., Scriver, L., Lam, L., Duong, M., Peirano, G., Lynch, T., Dong, T., Pitout, J. D. D., & DeVinney, R. (2020). A comprehensive account of *Escherichia coli* sequence type 131 in wastewater reveals an abundance of fluoroquinolone-resistant clade a strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(4), 1–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.01913-19>
- Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., & Wade, J. T. (2014). Comprehensive Mapping of the *Escherichia coli* Flagellar Regulatory Network. *PLoS Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004649>
- Flamm, R. K., Rhomberg, P. R., Lindley, J. M., Sweeney, K., Ellis-Grosse, E. J., & Shortridge, D. (2019). Evaluation of the bactericidal activity of fosfomycin in combination with selected antimicrobial comparison agents tested against Gram-negative bacterial strains by using time-kill curves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(5), 1–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.02549-18>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Forde, B. M., Ben Zakour, N. L., Stanton-Cook, M., Phan, M. D., Totsika, M., Peters, K. M., Chan, K. G., Schembri, M. A., Upton, M., & Beatson, S. A. (2014). The complete genome sequence of *Escherichia coli* EC958: A high quality reference sequence for the globally disseminated multidrug resistant *E. coli* O25b:H4-ST131 clone. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104400>
- Foster-Nyarko, E., Alikhan, N. F., Ravi, A., Thomson, N. M., Jarju, S., Kwambana-Adams, B. A., Secka, A., O'grady, J., Antonio, M., & Pallen, M. J. (2021). Genomic diversity of *Escherichia coli* isolates from backyard chickens and guinea fowl in the gambia. *Microbial Genomics*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000484>
- Freitag, C., Michael, G. B., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y., Hassel, M., & Schwarz, S. (2018).

- Occurrence and characterisation of ESBL-encoding plasmids among *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables. *Veterinary Microbiology*, 219(January), 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.028>
- Funnell, B. E. (2016). ParB partition proteins: Complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(AUG), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00044>
- Furlan, J. P. R., Lopes, R., Ramos, M. S., Rosa, R. da S., dos Santos, L. D. R., & Stehling, E. G. (2024). The detection of KPC-2, NDM-1, and VIM-2 carbapenemases in international clones isolated from fresh vegetables highlights an emerging food safety issue. *International Journal of Food Microbiology*, 420(February). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110765>
- Galetti, R., Filho, R. A. C. P., Ferreira, J. C., Varani, A. M., & Darini, A. L. C. (2019). Antibiotic resistance and heavy metal tolerance plasmids: The antimicrobial bulletproof properties of *Escherichia fergusonii* isolated from poultry. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1029–1033. <https://doi.org/10.2147/IDR.S196411>
- Garcillán-Barcia, M., Francia, M., & de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
- Garcillán-Barcia, M. Pilar, Cuartas-Lanza, R., Cuevas, A., & de la Cruz, F. (2019). Cis-Acting Relaxases Guarantee Independent Mobilization of MOBQ4 Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02557>
- Garcillán-Barcia, M. Pilar, Redondo-Salvo, S., Vielva, L., & de la Cruz, F. (2020). MOBscan: Automated annotation of MOB relaxases. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2075, pp. 295–308). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_21
- Garcillán-Barcia, Maria Pilar, Alvarado, A., & de la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 936–956. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00291.X>
- Garcillán-Barcia, Redondo-Salvo, S., & de la Cruz, F. (2023). Plasmid classifications. *Plasmid*, 126(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2023.102684>
- Gaub, A., & Rahman, K. M. (2023). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12(11), 1590. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>
- Getino, M., & De La Cruz, F. (2019). Natural and artificial strategies to control the conjugative transmission of plasmids. *Microbial Transmission*, 6, 33–64. <https://doi.org/10.1128/9781555819743.ch3>
- Giannattasio, M., & Branzei, D. (2019). DNA replication through strand displacement during lagging strand DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 10(2), 1–

25. <https://doi.org/10.3390/genes10020167>

- Gigliucci, F., van Hoek, A. H. A. M., Chiani, P., Knijn, A., Minelli, F., Scavia, G., Franz, E., Morabito, S., & Michelacci, V. (2021). Genomic Characterization of hlyF-positive Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Italy and the Netherlands, 2000-2019. *Emerging infectious diseases*, 27(3), 853–861. <https://doi.org/10.3201/eid2703.203110>
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME Journal*, 9(6), 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Gómez-Aldapa, C. A., Cerna-Cortes, J. F., Rangel-Vargas, E., Torres-Vitela, M. R., Villarruel-López, A., Gutiérrez-Alcántara, E. J., & Castro-Rosas, J. (2016a). Presence of Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, Enteropathogenic *E. coli* and Enterotoxigenic *E. coli*, on Raw Nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in Nopalitos Salads from Local Retail Markets in Mexico. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(5), 269–274. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2065>
- Gómez-Aldapa, C. A., Segovia-Cruz, J. A., Cerna-Cortes, J. F., Rangel-Vargas, E., Salas-Rangel, L. P., Gutiérrez-Alcántara, E. J., & Castro-Rosas, J. (2016b). Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food Microbiology*, 59, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.014>
- González, J. F., Hahn, M. M., & Gunn, J. S. (2018). Chronic biofilm-based infections: Skewing of the immune response. *Pathogens and Disease*, 76(3), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty023>
- Gophna, U., Barlev, M., Seiffers, R., Oelschlager, T. A., Hacker, J., & Ron, E. Z. (2001). Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 69(4), 2659–2665. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2659-2665.2001>
- Grilo, T., Freire, S., Miguel, B., Martins, L. N., Menezes, M. F., Nordmann, P., Poirel, L., Sousa, M. J. R., & Aires-de-Sousa, M. (2023). Occurrence of plasmid-mediated fosfomycin resistance (fos genes) among *Escherichia coli* isolates, Portugal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 35, 342–346. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.08.001>
- Grispoli, L., Karama, M., Hadjicharalambous, C., de Stefani, F., Ventura, G., Ceccarelli, M., Revoltella, M., Sechi, P., Crotti, C., D’Innocenzo, A., Couto-Contreras, G., & Cenci-Goga, B. (2020). Bovine lymph nodes as a source of *Escherichia coli* contamination of the meat. *International Journal of Food Microbiology*, 331(June). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108715>
- Grüll, M. P., Mulligan, M. E., & Lang, A. S. (2018). Small extracellular particles with big potential for horizontal gene transfer: Membrane vesicles and gene transfer agents. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny192>
- Güneri, C. Ö., Stingl, K., Grobbel, M., Hammerl, J. A., & Kürekci, C. (2022). Different fosA

- genes were found on mobile genetic elements in *Escherichia coli* from wastewaters of hospitals and municipals in Turkey. *Science of the Total Environment*, 824. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153928>
- Guo, Q., Tomich, A. D., McElheny, C. L., Cooper, V. S., Stoesser, N., Wang, M., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2016). Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2460–2465. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw177>
- Habib, I., Al-Rifai, R. H., Mohamed, M. Y. I., Ghazawi, A., Abdalla, A., Lakshmi, G., Agamy, N., & Khan, M. (2023). Contamination Levels and Phenotypic and Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Fresh Salad Vegetables in the United Arab Emirates. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8060294>
- Haenni, M., Métayer, V., Jarry, R., Drapeau, A., Puech, M. P., Madec, J. Y., & Keck, N. (2020). Wide Spread of blaCTX-M-9/mcr-9 IncHI2/ST1 Plasmids and CTX-M-9-Producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* in Rescued Wild Animals. *Frontiers in Microbiology*, 11(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601317>
- Haley, B. J., Kim, S. W., & Van Kessel, J. A. (2024). *Escherichia coli* Isolated from Bovine Sources Encoding the Fosfomycin Resistance Gene fosA7 .5 . *Foodborne Pathogens and Disease*, XX(XX). <https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0132>
- Hall, R. M. (2012). Integrons and gene cassettes: Hotspots of diversity in bacterial genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1267(1), 71–78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06588.x>
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology*, 15(4), 593–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>
- Han, L., Lu, X. Q., Liu, X. W., Liao, M. N., Sun, R. Y., Xie, Y., Liao, X. P., Liu, Y. H., Sun, J., & Zhang, R. M. (2021). Molecular epidemiology of fosfomycin resistant *E. coli* from a pigeon farm in china. *Antibiotics*, 10(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070777>
- Hayashi M, Matsui M, Sekizuka T, Shima A, Segawa T, Kuroda M, Kawamura K, Suzuki S. Dissemination of IncF group F1:A2:B20 plasmid-harboring multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 before the acquisition of blaCTX-M in Japan. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Dec;23:456-465. doi: 10.1016/j.jgar.2020.10.021.
- Ho, P. L., Chan, J., Lo, W. U., Law, P. Y., Li, Z., Lai, E. L., & Chow, K. H. (2013). Dissemination of plasmid-mediated fosfomycin resistance fosA3 among multidrug-resistant *Escherichia coli* from livestock and other animals. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), 695–702. <https://doi.org/10.1111/jam.12099>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>

- Hosain, M. Z., Lutful Kabir, S. M., & Kamal, M. M. (2021). Antimicrobial uses for livestock production in developing countries. *Veterinary World*, 14(1), 210–221. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2021.210-221>
- Hošťacká, A., Čižnár, I., & Štefkovičová, M. (2010). Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 55(1), 75–78. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0012-y>
- Hua, Y., Zhang, J., Jernberg, C., Chromek, M., Hansson, S., Frykman, A., Xiong, Y., Wan, C., Matussek, A., & Bai, X. (2021). Molecular Characterization of the Enterohemolysin Gene (ehxA) in Clinical Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. *Toxins*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.3390/toxins13010071>
- Huang, L., Cao, M., Hu, Y., Zhang, R., Xiao, Y., & Chen, G. (2021). Prevalence and mechanisms of fosfomycin resistance among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(1), 106226. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106226>
- Hubbard, A. T. M., Mason, J., Roberts, P., Parry, C. M., Corless, C., Aartsen, J. Van, Howard, A., Bulgasim, I., Fraser, A. J., Adams, E. R., Roberts, A. P., & Edwards, T. (2020). Piperacillin/tazobactam resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* due to IS 26 -mediated amplification of bla. *Nature Communications*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18668-2>
- Huisman, J. S., Benz, F., Duxbury, S. J. N., de Visser, J. A. G. M., Hall, A. R., Fischer, E. A. J., & Bonhoeffer, S. (2022). Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. *Plasmid*, 121(January), 102627. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102627>
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J., Dodson, K., Crowley, J., Heuser, J., Chapman, M., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J., & Hultgren, S. (2013). *Escherichia coli* Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure. *MBio.*, 4(5), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00645-13>. Editor
- Hussain M. A. (2016). Food Contamination: Major Challenges of the Future. *Foods (Basel, Switzerland)*, 5(2), 21. <https://doi.org/10.3390/foods5020021>
- Islam, M. S., Rahman, A. M. M. T., Hassan, J., & Rahman, M. T. (2023). Extended-spectrum beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from humans, animals, and environments in Bangladesh: A One Health perspective systematic review and meta-analysis. *One Health*, 16(November 2022), 100526. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100526>
- Ito, R., Mustapha, M. M., Tomich, A. D., Callaghan, J. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R. M. Q., Sluis-Cremer, N., & Doi, Y. (2017). Widespread fosfomycin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene. *MBio*, 8(4), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00749-17>
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., Beveridge, T. J.,

- Preston, J. F., & Romeo, T. (2008). Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3670–3680. <https://doi.org/10.1128/JB.01920-07>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jain, A., & Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), 87–96. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12241>
- Jiang, X., Ren, S., Geng, Y., Yu, T., Li, Y., Liu, L., Liu, G., Wang, H., & Shi, L. (2020). The *sug* operon involves in resistance to quaternary ammonium compounds in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(16), 7093–7104. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10741-6>
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2410–2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 76, 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Johnson, J. R., Clabots, C., Porter, S. B., Bender, T., Johnston, B. D., & Thurs, P. (2022). Intestinal Persistence of Colonizing *Escherichia coli* Strains, Especially ST131-H30, in Relation to Bacterial and Host Factors. *Journal of Infectious Diseases*, 225(12), 2197–2207. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab638>
- Ju, X., Wu, Y., Chen, G., & Zhang, R. (2023). *Escherichia coli* high-risk clone ST410 harboring bla NDM-13 isolated from hospital wastewater in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(39), 91487–91491. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28193-6>
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE*, 9(8), 104984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
- Kaderabkova, N., Bharathwaj, M., Furniss, R. C. D., Gonzalez, D., Palmer, T., & Mavridou, D. A. I. (2022). The biogenesis of β -lactamase enzymes. *Microbiology (United Kingdom)*, 168(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001217>
- Kamruzzaman, M., Wu, A. Y., & Iredell, J. R. (2021). Biological functions of type ii toxin-antitoxin systems in bacteria. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061276>
- Kao CY, Chen JW, Liu TL, Yan JJ, Wu JJ. Comparative Genomics of *Escherichia coli* Sequence Type 219 Clones From the Same Patient: Evolution of the IncI1 blaCMY-

Carrying Plasmid in Vivo. *Front Microbiol.* 2018 Jul 9;9:1518. doi: 10.3389/fmicb.2018.01518

- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205–218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Khalifa, H. O., Shikoray, L., Mohamed, M. Y. I., Habib, I., & Matsumoto, T. (2024). Veterinary Drug Residues in the Food Chain as an Emerging Public Health Threat: Sources, Analytical Methods, Health Impacts, and Preventive Measures. *Foods*, 13(11), 1–25. <https://doi.org/10.3390/foods13111629>
- Khan, S. A. (2005). Plasmid rolling-circle replication: Highlights of two decades of research. *Plasmid*, 53(2), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.12.008>
- Kieffer, N., Poirel, L., Descombes, M. C., & Nordmann, P. (2020). Characterization of FosL1, a plasmid-encoded fosfomycin resistance protein identified in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(4), 1–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.02042-19>
- Kim, J. W., Bugata, V., Cortés-Cortés, G., Quevedo-Martínez, G., & Camps, M. (2020). Mechanisms of Theta plasmid replication in enterobacteria and implications for adaptation to its host. *EcoSal Plus*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0026-2019>
- Kim, Y. J., Seo, K. H., Kim, S., & Bae, S. (2022). Phylogenetic Comparison and Characterization of an mcr-1-Harboring Complete Plasmid Genome Isolated from Enterobacteriaceae. *Microbial Drug Resistance*, 28(4), 492–497. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0164>
- Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Smets, B. F. (2015). Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME Journal*, 9, 934–945. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.191>
- Kromann, S., Baig, S., Olsen, R. H., Edslev, S. M., Thøfner, I., Bojesen, A. M., Jensen, H. E., & Stegger, M. (2023). Dramatic increase in slaughter condemnations due to *Escherichia coli* ST23 and ST101 within the Danish broiler production. *Veterinary Microbiology*, 280(April 2022). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109696>
- Kondratyeva K, Salmon-Divon M, Navon-Venezia S. Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci Rep.* 2020 Jan 8;10(1):36. doi: 10.1038/s41598-019-56763-7.
- Kukkonen, M., & Korhonen, T. K. (2004). The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: From housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.01.003>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2021). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella Infantis* isolated from raw chicken meat samples

- and insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337(October 2020), 108956. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- Kurittu, P., Khakipoor, B., Aarnio, M., Nykäsenoja, S., Brouwer, M., Myllyniemi, A. L., Vatunen, E., & Heikinheimo, A. (2021). Plasmid-Borne and Chromosomal ESBL/AmpC Genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Global Food Products. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.592291>
- Laganenka, L., Colin, R., & Sourjik, V. (2016). Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms12984>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2013). Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.028>
- Law, C. J., Enkavi, G., Wang, D. N., & Tajkhorshid, E. (2009). Structural basis of substrate selectivity in the glycerol-3-phosphate: Phosphate antiporter GlpT. *Biophysical Journal*, 97(5), 1346–1353. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.026>
- Lawrence, J. G. (1999). Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5), 519–523. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00010-7)
- Lee, S., Teng, L., DiLorenzo, N., Weppelmann, T. A., & Jeong, K. C. (2020). Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase Producing *Escherichia coli* in Grazing Beef Cattle. *Frontiers in Microbiology*, 10(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03076>
- Lee W, Ha J, Choi J, Jung Y, Kim E, An ES, Kim SH, Shin H, Ryu S, Kim SH, Kim HY. (2024). Genetic and virulence characteristics of hybrid Shiga toxin-producing and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in South Korea. *Front Microbiol*. 2024 May 15;15:1398262. doi: 10.3389/fmicb.2024.1398262.
- Lei, C. W., Yao, T. G., Yan, J., Li, B. Y., Wang, X. C., Zhang, Y., Gao, Y. F., & Wang, H. N. (2020). Identification of *Proteus* genomic island 2 variants in two clonal *Proteus mirabilis* isolates with coexistence of a novel genomic resistance island PmGR11. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2503–2507. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa215>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li M, Wu M, Sun Y, Sun L. (2022). *Edwardsiella tarda* TraT is an anti-complement factor and a cellular infection promoter. *Commun Biol*. 2022 Jun 29;5(1):637. doi: 10.1038/s42003-022-03587-3
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets

- of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>
- Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2018). OriTfinder: A web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W229–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>
- Lilly, J., & Camps, M. (2015). Mechanisms of Theta Plasmid Replication. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 33–44. <https://doi.org/10.1128/9781555818982.ch3>
- Lima-Moreira, L., Silva, B. N. M. da, Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Lima, T., & Domingues, S. (2020). Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences*. <https://doi.org/DOI: 10.3390/vetsci7030110>
- Lipworth, S., Matlock, W., Shaw, L., Vihta, K. D., Rodger, G., Chau, K., Barker, L., George, S., Kavanagh, J., Davies, T., Vaughan, A., Andersson, M., Jeffery, K., Oakley, S., Morgan, M., Hopkins, S., Peto, T., Crook, D., Walker, A. S., & Stoesser, N. (2024). The plasmidome associated with Gram-negative bloodstream infections: A large-scale observational study using complete plasmid assemblies. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45761-7>
- Liu, B. T., & Song, F. J. (2019). Emergence of two *Escherichia coli* strains co-harboring mcr-1 and blaNDM in fresh vegetables from China. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2627–2635. <https://doi.org/10.2147/IDR.S211746>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, H., Wang, H., Huang, M., Mei, Y., Gu, B., Wu, R., Huang, Y., Chen, Y., Xu, Y., & Wang, T. (2013). Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *Journal of Thoracic Disease*, 5(2), 149–155. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.03.09>
- Liu, X., Yao, H., Zhao, X., & Ge, C. (2023). Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, 28(6). <https://doi.org/10.3390/molecules28062432>
- Liu, Z., Wang, K., Zhang, Y., Xia, L., Zhao, L., Guo, C., Liu, X., Qin, L., & Hao, Z. (2022). High Prevalence and Diversity Characteristics of blaNDM, mcr, and bla ESBLs Harboring Multidrug-Resistant *Escherichia coli* From Chicken, Pig, and Cattle in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.755545>
- Lizarraga-Magaña, J. A. (2023). Secuenciación y genómica comparativa de cepas de *Escherichia coli* de origen ambiental, animal y clínico aisladas en Sinaloa.

Universidad Autónoma de Sinaloa.Repositorio de la Universidad Autónoma de Sinaloa. http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/handle/DGB_UAS/542

- Loras, C., González-Prieto, A., Pérez-Vázquez, M., Bautista, V., Ávila, A., Campoy, P. S., Oteo-Iglesias, J., & Alós, J. I. (2021). Prevalence, detection and characterisation of fosfomicin-resistant *Escherichia coli* strains carrying fosA genes in Community of Madrid, Spain. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.032>
- Lu, W., Qiu, Q., Chen, K., Zhao, R., Li, Q., & Wu, Q. (2022). Distribution and Molecular Characterization of Functional Class 2 Integrons in Clinical *Proteus mirabilis* Isolates. *Infection and Drug Resistance*, 15(January), 465–474. <https://doi.org/10.2147/IDR.S347119>
- Ludden, C., Decano, A. G., Jamrozy, D., Pickard, D., Morris, D., Parkhill, J., Peacock, S. J., Cormican, M., & Downing, T. (2020). Genomic surveillance of *Escherichia coli* ST131 identifies local expansion and serial replacement of subclones. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000352>
- Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M. M. P., Martínez De La Peña, C., Silva, J. L., & Luna-Guevara, M. L. (2019). The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2894328>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2010). Ag43 promotes persistence of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in the urinary tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2316–2317. <https://doi.org/10.1128/JCM.00611-10>
- Lv, L. C., Wang, C. Z., Yu, J. J., Jiao, Y. X., Deng, L. M., He, W. Y., Gao, G. L., Zhang, X. Y., Lu, L. T., Gao, X., Liu, Y. Y., & Liu, J. H. (2024). Emergence of bla_{NDM-5}-bearing IncHI2/ST2 and p0111 multidrug-resistance plasmids and widespread distribution of IncHI2/ST3–bla_{NDM-5} plasmids across foods, animals, and humans. *Food Control*, 159. 110296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110296>
- Ma, Y., Xu, X., Guo, Q., Wang, P., Wang, W., & Wang, M. (2015). Characterization of fosA5, A new plasmid-mediated fosfomicin resistance gene in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 60(3), 259–264. <https://doi.org/10.1111/lam.12366>
- Ma, Z., Bumunang, E. W., Stanford, K., Bie, X., Niu, Y. D., & McAllister, T. A. (2019). Biofilm formation by shiga toxin-producing *Escherichia coli* on stainless steel coupons as affected by temperature and incubation time. *Microorganisms*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040095>
- MacFaddin J.F. (2003). *MacFaddin's Manual of Biochemical Tests for the Identification of Clinically Important Bacteria* (Williams and Wilkins Co. (ed.)).
- Madec, J. Y., & Haenni, M. (2018). Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid*, 99, 72–81. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2018.09.001>
- Mageiros, L., Méric, G., Bayliss, S. C., Pensar, J., Pascoe, B., Mourkas, E., Calland, J.

- K., Yahara, K., Murray, S., Wilkinson, T. S., Williams, L. K., Hitchings, M. D., Porter, J., Kemmett, K., Feil, E. J., Jolley, K. A., Williams, N. J., Corander, J., & Sheppard, S. K. (2021). Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>
- Manageiro, V., Jones-dias, D., Ferreira, E., & Caniça, M. (2020). Plasmid-mediated colistin resistance (Mcr-1) in *Escherichia coli* from non-imported fresh vegetables for human consumption in Portugal. *Microorganisms*, 8(3), 4–10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030429>
- 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), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.011>
- Matamoros, S., Van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemse, N., Melles, D. C., Penders, J., Nguyen Vinh, T., Hoa, N. T., Bootsma, M. C. J., Van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Lashof, A. M. L. O., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., De Jong, M. D., & Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction OPEN. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>
- Mathlouthi, A., Pennacchietti, E., & De Biase, D. (2018). Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 10(4), 129–132. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-129-132>
- Mattioni-Marchetti, V., Kraftova, L., Finianos, M., Sourenian, T., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Polyclonal Spread of Fosfomycin Resistance among Carbapenemase-Producing Members of the Enterobacterales in the Czech Republic. *Microbiology Spectrum*, 11(3), 1–16. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00095-23>
- Mattioni Marchetti, V., Hrabak, J., & Bitar, I. (2023). Fosfomycin resistance mechanisms in Enterobacterales: an increasing threat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13(July), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1178547>
- Mazé, A., Glatter, T., & Bumann, D. (2014). The central metabolism regulator EIIAGlc switches salmonella from growth arrest to acute virulence through activation of virulence factor secretion. *Cell Reports*, 7(5), 1426–1433. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.022>
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J. V., Spanogiannopoulos, P., Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- Meena, P. R., Priyanka, P., & Singh, A. P. (2023). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork.” *Letters in Applied Microbiology*, 76(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1093/lambio/ovac016>

- Meena, P. R., Yadav, P., Hemlata, H., Tejavath, K. K., & Singh, A. P. (2021). Poultry-origin extraintestinal *Escherichia coli* strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 2087–2101. <https://doi.org/10.1111/JAM.14905>
- Menck-Costa, M. F., Baptista, A. A. S., Gazal, L. E. de S., Justino, L., Sanches, M. S., de Souza, M., Nishio, E. K., Queiroz dos Santos, B., Cruz, V. D., Berbert, J. V. M., Gonçalves, B. C., Andrade, G., Vespero, E. C., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. T. (2022). High-Frequency Detection of fosA3 and blaCTX–M–55 Genes in *Escherichia coli* From Longitudinal Monitoring in Broiler Chicken Farms. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846116>
- Mendoza IC, Luna EO, Pozo MD, Vásquez MV, Montoya DC, Moran GC, Romero LG, Yépez X, Salazar R, Romero-Peña M, León JC. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. *Lebensm Wiss Technol.* 2022 Aug 1;165:113714. doi: 10.1016/j.lwt.2022.113714.
- Merino, I., Porter, S. B., Johnston, B., Clabots, C., Thuras, P., Ruiz-Garbajosa, P., Cantón, R., & Johnson, J. R. (2020). Molecularly defined extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* status predicts virulence in a murine sepsis model better than does virotype, individual virulence genes, or clonal subset among *E. coli* ST131 isolates. *Virulence*, 11(1), 327–336. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1747799>
- Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Michalopoulos, A., Virtzili, S., Rafailidis, P., Chalevelakis, G., Damala, M., & Falagas, M. E. (2010). Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: A prospective evaluation. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(2), 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02921.x>
- Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., & Yanagawa, H. (2019). Massive outbreak of *E. coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 150(8), 379–399. <https://doi.org/10.31826/9781463222413-001>
- Mickey, A., & Nataro, J. (2020). Dual Function of Aar, a Member of the New AraC Negative Regulator Family, in *Escherichia coli* Gene Expression. *American Society for Microbiology*, February, 1–12. <https://doi.org/DOI: 10.1128/IAI.00100-20>
- Millan, A. S., Escudero, J. A., Gifford, D. R., Mazel, Di., & MacLean, R. C. (2016). Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology and Evolution*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>
- Milner, K. A., Bay, D. C., Alexander, D., Sharma, M. K., & Zhanel, G. (2020). Identification and Characterization of a Novel FosA7 Member from Fosfomycin-Resistant

- Escherichia coli* Clinical Isolates from Canadian Hospitals. American Society for Microbiology, 3(December), 1–5. <https://doi.org/DOI: 10.1128/AAC.00865-20>
- Miranda, J. M., Mondragon, A., Rodriguez, J. A., Guarddon, M., Nebot, C. G., Galán-Vidal, C. A., & Coronel-Olivares, C. (2010). Presence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from foodstuffs in Hidalgo State (Mexico) Presencia y resistencia a antimicrobianos de *Escherichia coli* aislados a partir de alimentos en el estado de Hidalgo (México). CYTA - Journal of Food, 8(1), 15–21. <https://doi.org/10.1080/19476330903119234>
- Moon, S. H., Udaondo, Z., Abram, K. Z., Li, X., Yang, X., DiCaprio, E. L., Jun, S. R., & Huang, E. (2022). Isolation of AmpC- and extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriales from fresh vegetables in the United States. Food Control, 132, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108559>
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. International Microbiology, 14(3), 121–141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>
- Morales Barroso, I., López-Cerero, L., Navarro, M. D., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Pascual, A., & Rodríguez-Baño, J. (2018). Intestinal colonization due to *Escherichia coli* ST131: Risk factors and prevalence. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0427-9>
- Mota-Bravo, L., Camps, M., Muñoz-Gutiérrez, I., Tatarenkov, A., Warner, C., Suarez, I., & Cortés-Cortés, G. (2023). Detection of Horizontal Gene Transfer Mediated by Natural Conjugative Plasmids in *E. coli*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 193. <https://doi.org/10.3791/64523>
- Moura-Machado, M. A., Panzenhagen, P., Lázaro, C., Rojas, M., Figueiredo, E. E. de S., & Conte-Junior, C. A. (2024). Unveiling the High Diversity of Clones and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Originating from ST10 across Different Ecological Niches. Antibiotics, 13(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080737>
- Müller, A., Stephan, R., & Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. Science of the Total Environment, 541, 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.135>
- Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cellular Microbiology, 4(5), 257–271. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00193.x>
- Munita, J., & Arias, C. A. (2016). Phenotypic Tests for the Detection of β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Different Environments. Current Microbiology, 73(1), 132–138. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1036-6>
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Helloin, E., Pénary, M., Nougayrède, J. P., Dozois, C. M., Hayashi, T., & Oswald, E. (2016). HlyF Produced by Extraintestinal

- Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(5), 856–865. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV506>
- Mushtaq, S., Irfan, S., Sarma, J. B., Doumith, M., Pike, R., Pitout, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2011). Phylogenetic diversity of *Escherichia coli* strains producing NDM-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2002–2005. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr226>
- Nagy, A., Mowery, J., Bauchan, G. R., Wang, L., Nichols-Russell, L., & Nou, X. (2015). Role of extracellular structures of *Escherichia coli* O157:H7 in initial attachment to biotic and abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4720–4727. <https://doi.org/10.1128/AEM.00215-15>
- Nakamura, H., Takakura, K. I., Sone, Y., Itano, Y., & Nishikawa, Y. (2013). Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *Journal of Food Protection*, 76(7), 1179–1186. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-225>
- Nakano, A., Nakano, R., Nishisouzu, R., Suzuki, Y., Horiuchi, S., Kikuchi-Ueda, T., Ubagai, T., Ono, Y., & Yano, H. (2021). Prevalence and Relatedness of mcr-1-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan. *Frontiers in Microbiology*, 12(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664931>
- Nasrollahian, S., Graham, J. P., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(April), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- Nedeljković, M., Sastre, D. E., & Sundberg, E. J. (2021). Bacterial flagellar filament: A supramolecular multifunctional nanostructure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147521>
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., & Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., Nkansa-Gyamfi, N. A., Stålsby Lundborg, C., & Lien, L. T. Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, 51(4), 381–395. <https://doi.org/10.1128/mr.51.4.381-395.1987>
- Oh, S. S., Song, J., Kim, J., & Shin, J. (2020). Increasing prevalence of multidrug-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates from fresh vegetables and healthy food animals in South Korea. *International Journal of Infectious Diseases*, 92, 53–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.025>

- Omer, M. K., Álvarez-Ordoñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., & Alvseike, O. A. (2018). A Systematic Review of Bacterial Foodborne Outbreaks Related to Red Meat and Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(10), 598–611. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2393>
- Oniciuc, E. A., Likotrafiti, E., Alvarez-Molina, A., Prieto, M., López, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2019). Food processing as a risk factor for antimicrobial resistance spread along the food chain. *Current Opinion in Food Science*, 30, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.09.002>
- Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, M., Ohnishi, M., Nakayama, K., Terajima, J., Watanabe, H., & Hayashi, T. (2009). Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. *Genome Research*, 19(10), 1809–1816. <https://doi.org/10.1101/gr.089615.108>
- Oteo, J., Diestra, K., Juan, C., Bautista, V., Novais, Â., Pérez-Vázquez, M., Moyá, B., Miró, E., Coque, T. M., Oliver, A., Cantón, R., Navarro, F., & Campos, J. (2009). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(2), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006>
- Ovi, F., Zhang, L., Nabors, H., Jia, L., & Adhikari, P. (2023). A compilation of virulence-associated genes that are frequently reported in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) compared to other *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3), 1–20. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad014>
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., & Karıptaş, E. (2023). The Determination, Monitoring, Molecular Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 259–277. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00895-y>
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M. M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., & Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4264–4269. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003>
- Pajand, O., Rahimi, H., Darabi, N., Roudi, S., Ghassemi, K., Aarestrup, F. M., & Leekitcharoenphon, P. (2021). Arrangements of Mobile Genetic Elements among Virotype E Subpopulation of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Strains with High Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Content . *MSphere*, 6(4), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msphere.00550-21>
- Pakbin, B., M Brück, W., & WA Rossen, J. (2021). Factores de virulencia de *Escherichia coli* patógena entérica . *International Journal of Molecular Sciences*, 1–18.
- Pan, Y., Hu, B., Bai, X., Yang, X., Cao, L., Liu, Q., Sun, H., Li, J., Zhang, J., Jin, D., & Xiong, Y. (2021). Antimicrobial resistance of non-o157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and domestic animals. *Antibiotics*, 10(1), 1–

13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010074>

- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peirano, G., Matsumura, Y., Adams, M. D., Bradford, P., Motyl, M., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. D. (2018). Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015-2017. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), 2008–2014.
- Peng, Z., Li, X., Hu, Z., Li, Z., Lv, Y., Lei, M., Wu, B., Chen, H., & Wang, X. (2019). Characteristics of carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and MCR-1 from pig farms in China. *Microorganisms*, 7(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110482>
- Pfeifer, Y., Trifonova, A., Pietsch, M., Brunner, M., Todorova, I., Gergova, I., Wilharm, G., Werner, G., & Savov, E. (2017). Clonal transmission of gram-negative bacteria with carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 301–307. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0059>
- Philippon, A., Jacquier, H., Ruppé, E., & Labia, R. (2019). Structure-based classification of class A beta-lactamases, an update. *Current Research in Translational Medicine*, 67(4), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.05.003>
- Pianciola, L., & Rivas, M. (2018). Genotypic features of clinical and bovine *Escherichia coli* O157 strains isolated in countries with different associated-disease incidences. *Microorganisms*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020036>
- Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Hamprecht, A., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Kreienbrock, L., Pfeifer, Y., Fuchs, S., Werner, G., Bühling, A., Domurath, B., Wendt, C., Valenza, G., Wahl, H. G., Hellkamp, J., Hering, J. (2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genomics*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4976-3>
- Pilar Garcilí an-Barcia, M., Victoria Francia, M., & de la Cruz, F. (n.d.). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
- Pitout, J. D. D., & Finn, T. J. (2020). The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infection, Genetics and Evolution*, 81, 104265. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104265>
- Pohlman, R. F., & Figurski, D. H. (1983). Essential genes of plasmid RK2 in *Escherichia coli*: trfB region controls a kil gene near trfA. *Journal of Bacteriology*, 156(2), 584–591. <https://doi.org/10.1128/jb.156.2.584-591.1983>
- Poirel, L., Kieffer, N., & Nordmann, P. (2017). In vitro study of ISApI1-mediated mobilization of the colistin resistance gene mcr-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), 1–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00127-17>

- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0026-2017>
- Poirel, L., Vuillemin, X., Kieffer, N., Mueller, L., Descombes, M. C., & Nordmann, P. (2019). Identification of FosA8, a Plasmid-Encoded Fosfomycin Resistance Determinant from *Escherichia coli*, and Its Origin in *Leclercia adecarboxylata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), 1–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.01403-19>
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The Diversity of *Escherichia coli* Pathotypes and Vaccination Strategies against This Versatile Bacterial Pathogen. *Microorganisms*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020344>
- Pontikis, K., Karaiskos, I., Bastani, S., Dimopoulos, G., Kalogirou, M., Katsiari, M., Oikonomou, A., Poulakou, G., Roilides, E., & Giamarellou, H. (2014). Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.010>
- Preda, V., & Sandulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), e10. <https://doi.org/10.15190/d.2019.13>
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V., Nordstrom, L., Billig, M., Chattopadhyay, S., Stegger, M., Andersen, P. S., Pearson, T., Riddell, K., Rogers, P., Scholes, D., Kahl, B., Keim, P., & Sokurenko, E. V. (2013). The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*, 4(6), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00377-13>
- Prieto, A., Urcola, I., Blanco, J., Dahbi, G., Muniesa, M., Quiros, P., Falgenhauer, L., Chakraborty, T., Huttener, M., & Juarez, A. (2016). Tracking bacterial virulence: Global modulators as indicators. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep25973>
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: Role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2(4), 450–464. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Priyanka, Meena PR, Meghwanshi KK, Rana A, Singh AP. Leafy greens as a potential source of multidrug-resistant diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Microbiology (Reading)*. 2021 Jun;167(6). doi: 10.1099/mic.0.001059.
- Priyanka, P., Meena, P. R., Raj, D., Rana, A., Dhanokar, A., Duggirala, K. S., & Singh, A. P. (2023). Urinary tract infection and sepsis causing potential of multidrug-resistant Extraintestinal pathogenic *E. coli* isolated from plant-origin foods. *International Journal of Food Microbiology*, 386(November 2022), 110048. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110048>

- Ramadan, H., Soliman, A. M., Hiott, L. M., Elbediwi, M., Woodley, T. A., Chattaway, M. A., Jenkins, C., Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2021). Emergence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Producing CTX-M, MCR-1, and FosA in Retail Food From Egypt. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(July). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.681588>
- Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K. A., Webb, H. E., Fernández-López, R., & de la Cruz, F. (2021a). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04299-x>
- Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K. A., Webb, H. E., Fernández-López, R., & de la Cruz, F. (2021b). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinformatics* 2021 22:1, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12859-021-04299-X>
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>
- Reffert, J. L., & Smith, W. J. (2014). Fosfomycin for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections: Insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*, 34(8), 845–857. <https://doi.org/10.1002/phar.1434>
- Reid, C. J., McKinnon, J., & Djordjevic, S. P. (2019). Clonal ST131-H22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microbial Genomics*, 5(9). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000295>
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Riley, L. W. (2014). Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 380–390. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12646>
- Robertson, J., & Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, 4(8). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>
- Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing? In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 6, Issue NOV, p. 141). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>
- Rodrigues, S. V., Laviniki, V., Borges, K. A., Furian, T. Q., Moraes, H. L. S., Nascimento, V. P., & Salle, C. T. P. (2019). Biofilm Formation by Avian Pathogenic *Escherichia coli* is Not Related to In Vivo Pathogenicity. *Current Microbiology*, 76(2), 194–199. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1608-8>

- Rodriguez-beltran, J., Hernandez-beltran, J. C. R., & Delafuente, J. (2018). Europe PMC Funders Group Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. 2018(5), 873–881. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0529-z.Multicopy>
- Romanchuk, A., Jones, C. D., Karkare, K., Moore, A., Smith, B. A., Jones, C., Dougherty, K., & Baltrus, D. A. (2014). Bigger is not always better: Transmission and fitness burden of ~1MB *Pseudomonas syringae* megaplasmid pMPPla107. *Plasmid*, 73, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.04.002>
- Ruiz-Masó, J., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., & Solar, G. (2024). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiology Spec*, 1–23. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014.f1>
- Ryu, J. H., Kim, H., & Beuchat, L. R. (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2123–2131. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.10.2123>
- Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A., & Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(2), 136–142. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208>
- Sadek, M., Poirel, L., Nordmann, P., Nariya, H., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2020). Draft genome sequence of an mcr-1/Incl2-carrying multidrug-resistant *Escherichia coli* B1:ST101 isolated from meat and meat products in Egypt. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 20, 41–42. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.015>
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996–4001. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004>
- San Millan, A., & Maclean, R. C. (2019). Fitness costs of plasmids: A limit to plasmid transmission. *Microbial Transmission*, 19, 65–79. <https://doi.org/10.1128/9781555819743.ch4>
- Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
- Santos, A. C. de M., Santos, F. F., Silva, R. M., & Gomes, T. A. T. (2020). Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
- Santos, A. C., Silva, R. M., Valiatti, T., Santos, F., Santos-Neto, J., Cayo, R., Streling, A., Nodari, C., Gales, A., Nishiyama, M., Carvalho, E., & Gomes, T. (2020). Virulence Potential of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Belonging to the Emerging Clonal Group ST101-B1 Isolated from Bloodstream Infection. *Microorganisms*, 93(1),

445–450. <https://doi.org/10.1128/jb.93.1.445-450.1967>

- Sapkota, S., Adhikari, S., Khadka, S., Adhikari, M., Kandel, H., Pathak, S., Pandey, A., & Pandey, A. (2019). Multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing *E. coli* and Salmonella on raw vegetable salads served at hotels and restaurants in Bharatpur, Nepal. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4557-9>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13099-019-0290-0>
- Schwartz, L., de Dios Ruiz-Rosado, J., Stonebrook, E., Becknell, B., & Spencer, J. D. (2023). Uropathogen and host responses in pyelonephritis. *Nature Reviews Nephrology*, 19(10), 658–671. <https://doi.org/10.1038/s41581-023-00737-6>
- Schwidder, M., Heinisch, L., & Schmidt, H. (2019). Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin. *Toxins*, 50(1–2), 74–80. <https://doi.org/DOI:10.3390/toxins11090502>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sellera, F. P., Fernandes, M. R., Moura, Q., Carvalho, M. P. N., & Lincopan, N. (2018). Extended-spectrum-B-lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in wild fishes from a polluted area in the Atlantic Coast of South America. *Marine Pollution Bulletin*, 135(March), 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.012>
- Shin, H., Kim, Y., Han, D., & Hur, H. G. (2021). Emergence of High Level Carbapenem and Extensively Drug Resistant *Escherichia coli* ST746 Producing NDM-5 in Influent of Wastewater Treatment Plant, Seoul, South Korea. *Frontiers in Microbiology*, 12(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645411>
- Shrestha, L., Kayama, S., Sasaki, M., Kato, F., Hisatsune, J., Tsuruda, K., Koizumi, K., Tatsukawa, N., Yu, L., Takeda, K., & Sugai, M. (2016). Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbiology and Immunology*, 60(3), 148–159. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12359>
- Shropshire, W. C., Aitken, S. L., Pifer, R., Kim, J., Bhatti, M. M., Li, X., Kalia, A., Galloway-Penã, J., Sahasrabhojane, P., Arias, C. A., Greenberg, D. E., Hanson, B. M., & Shelburne, S. A. (2021). IS26-mediated amplification of blaOXA-1 and blaCTX-M-15 with concurrent outer membrane porin disruption associated with de novo carbapenem resistance in a recurrent bacteraemia cohort. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(2), 385–395. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa447>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. 34, 32–36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

- Siguier, Patricia, Campos, M., Cornet, F., Bouet, J. Y., & Guynet, C. (2023). Atypical low-copy number plasmid segregation systems, all in one? *Plasmid*, 127(February), 102694. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2023.102694>
- Silkie, S. S., Tolcher, M. P., & Nelson, K. L. (2008). Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, 72(3), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.12.011>
- Skyberg, J. A., Siek, K. E., Doetkott, C., & Nolan, L. K. (2007). Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 548–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03076.x>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & Cruz, F. de la. (2010a). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 434. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & Cruz, F. de la. (2010b). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 434. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Smit, C. C. H., Lambert, M., Rogers, K., Djordjevic, S. P., Van Oijen, A. M., Keighley, C., Taxis, K., Robertson, H., & Pont, L. G. (2023). One Health Determinants of *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Humans in the Community: An Umbrella Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417204>
- Snyder, E. E., Kampanya, N., Lu, J., Nordberg, E. K., Karur, H. R., Shukla, M., Soneja, J., Tian, Y., Xue, T., Yoo, H., Zhang, F., Dharmanolla, C., Dongre, N. V., Gillespie, J. J., Hamelius, J., Hance, M., Huntington, K. I., Jukneliene, D., Koziski, J., Sobral, B. W. S. (2007). PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 401–406. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl858>
- Song, J., Oh, S. S., Kim, J., Park, S., & Shin, J. (2020). Clinically Relevant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates From Food Animals in South Korea. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00604>
- Song, J., Oh, S. S., Kim, J., & Shin, J. (2020). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from raw vegetables in South Korea. *Scientific Reports*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76890-w>
- Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., Kim, K. S., Johnson, J. R., & Mobley, H. L. T. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, fyua, chua, and yfvc efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, 80(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>
- Srinivasan, U., Foxman, B., & Marrs, C. F. (2003). Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 285–289. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.285-289.2003>

- Sugawara, Y., Hagiya, H., Akeda, Y., Takeuchi, D., Sakamoto, N., Matsumoto, Y., Motooka, D., Nishi, I., Tomono, K., & Hamada, S. (2021). Community spread and acquisition of clinically relevant *Escherichia coli* harbouring blaNDM among healthy Japanese residents of Yangon, Myanmar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(6), 1448–1454. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab070>
- Sukupolvi, S., & O'Connor, D. (1990). TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiology*, 54(4), 331–341.
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>
- Sun, J., Dai, J., Chen, J., He, Y., Su, L., Gong, M., Cao, M., Wei, K., You, Y., Liu, L., Bai, L., Cui, S., Chen, J., & Yang, B. (2024). Antibiotic susceptibility and genomic analysis of ciprofloxacin-resistant and ESBLs-producing *Escherichia coli* in vegetables and their irrigation water and growing soil. *International Journal of Food Microbiology*, 414(February). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110629>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tang, B., Chang, J., Cao, L., Luo, Q., Xu, H., Lyu, W., Qian, M., Ji, X., Zhang, Q., Xia, X., & Yang, H. (2019). Characterization of an NDM-5 carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST156 isolate from a poultry farm in Zhejiang, China. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1454-2>
- Ten Doesschate, T., Abbott, I. J., Willems, R. J. L., Top, J., Rogers, M. R. C., Bonten, M. M., & Paganelli, F. L. (2019). In vivo acquisition of fosfomycin resistance in *Escherichia coli* by fosA transmission from commensal flora. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(12), 3630–3632. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz380>
- Tetzschner, A. M. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O., & Scheutz, F. (2020). In Silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(10). <https://doi.org/10.1128/JCM.01269-20>
- Thomas, G. A., Paradell Gil, T., Müller, C. T., Rogers, H. J., & Berger, C. N. (2024). From field to plate: How do bacterial enteric pathogens interact with ready-to-eat fruit and vegetables, causing disease outbreaks? *Food Microbiology*, 117(May 2023), 104389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104389>
- Tokuda, M., & Shintani, M. (2024). Microbial evolution through horizontal gene transfer by mobile genetic elements. *Microbial Biotechnology*, 17(1), 1–15.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.14408>

- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Torres-Vitela, M. D. R., Gómez Aldapa, C. A., Cerna-Cortes, J. F., Villarruel-López, A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*, 56(3), 180–185. <https://doi.org/10.1111/lam.12030>
- Torres, A. N., Chamorro-Veloso, N., Costa, P., Cádiz, L., Canto, F. Del, Venegas, S. A., Nitsche, M. L., Coloma-Rivero, R. F., Montero, D. A., & Vidal, R. M. (2020). Deciphering Additional Roles for the EF-Tu, I-Asparaginase II and OmpT Proteins of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081184>
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Tsang, J. (2017). Bacterial plasmid addiction systems and their implications for antibiotic drug development. *Postdoc Journal*, 5(5), 3. <https://doi.org/10.14304/surya.jpr.v5n5.2>
- Tsoumtsas Meda, L. L., Landraud, L., Petracchini, S., Descorps-Declere, S., Perthame, E., Nahori, M. A., Ramirez Finn, L., Ingersoll, M. A., Patiño-Navarrete, R., Glaser, P., Bonnet, R., Dussurget, O., Denamur, E., Mettouchi, A., & Lemichez, E. (2022). The *cnf1* gene is associated with an expanding *Escherichia coli* ST131 H30Rx/C2 subclade and confers a competitive advantage for gut colonization. *Gut Microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2121577>
- Turkovicova, L., Smidak, R., Jung, G., Turna, J., Lubec, G., & Aradska, J. (2016). Proteomic analysis of the TerC interactome: Novel links to tellurite resistance and pathogenicity. *Journal of Proteomics*, 136, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.003>
- Uhlich, G. A., Chen, C. Y., Cottrell, B. J., & Nguyen, L. H. (2014). Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157: H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 354(2), 133–141. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12439>
- Van Hoek, A. H. A. M., Stalenhoef, J. E., van Duijkeren, E., & Franz, E. (2016). Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolated from broilers, humans on broiler farms and in the general population and UTI patients. *Veterinary Microbiology*, 194(2015), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.008>
- Vardakas, K. Z., Legakis, N. J., Triarides, N., & Falagas, M. E. (2016). Susceptibility of

- contemporary isolates to fosfomycin: a systematic review of the literature. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(4), 269–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.001>
- Vassallo, A., Amoriello, R., Guri, P., Casbarra, L., Ramazzotti, M., Zaccaroni, M., Ballerini, C., Cavalieri, D., & Marvasi, M. (2023). Adaptation of Commensal *Escherichia coli* in Tomato Fruits: Motility, Stress, Virulence. *Biology*, 12(4), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biology12040633>
- Vázquez, X., Fernández, J., Rodríguez-Lozano, J., Calvo, J., Rodicio, R., & Rodicio, M. R. (2022). Genomic Analysis of Two MDR Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Infantis from a Spanish Hospital Bearing the blaCTX-M-65 Gene with or without fosA3 in pESI-like Plasmids. *Antibiotics*, 11(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060786>
- Vilas Boas, D., Castro, J., Araújo, D., Nóbrega, F. L., Keevil, C. W., Azevedo, N. F., Vieira, M. J., & Almeida, C. (2024). The Role of Flagellum and Flagellum-Based Motility on *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Microorganisms*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020232>
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12), 2518–2529. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq347>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: From the cellular to the community level. *Genes*, 11(11), 1–33. <https://doi.org/10.3390/GENES11111239>
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D. N., Jubelin, G., & Jacques, M. (2016). Biofilm-Forming Abilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates Associated with Human Infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1448–1458. <https://doi.org/10.1128/AEM.02983-15.Editor>
- Vyas, H. K. N., Xia, B., & Mai-Prochnow, A. (2022). Clinically relevant in vitro biofilm models: A need to mimic and recapitulate the host environment. *Biofilm*, 4(January), 100069. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100069>
- Wachino, J. I., Yamane, K., Suzuki, S., Kimura, K., & Arakawa, Y. (2010). Prevalence of fosfomycin resistance among CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in Japan and identification of novel plasmid-mediated fosfomycin-modifying enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 3061–3064. <https://doi.org/10.1128/AAC.01834-09>
- Wagenlehner, F. M. E., & Dittmar, F. (2022). Re: Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *European Urology*, 82(6), 658. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.08.023>
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., Mowlem, M. C., & Lees, D. N. (2017). A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*, 126, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.032>

- Wang, J., Huang, Y., Guan, C., Li, J., Yang, H., Zhao, G., Liu, C., Ma, J., & Tang, B. (2023). Characterization of an *Escherichia coli* Isolate Coharboring the Virulence Gene *astA* and Tigecycline Resistance Gene *tet(X4)* from a Dead Piglet. *Pathogens*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/pathogens12070903>
- Wang, M. G., Zhang, R. M., Wang, L. L., Sun, R. Y., Bai, S. C., Han, L., Fang, L. X., Sun, J., Liu, Y. H., & Liao, X. P. (2021). Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Escherichia coli* from duck farms in south-east coastal China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(2), 322–329. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa433>
- Wang, M., Goh, Y. X., Tai, C., Wang, H., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2022a). VRprofile2: Detection of antibiotic resistance-associated mobilome in bacterial pathogens. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), 768773. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac321>
- Wang, S., Cheng, G., Yu, Y., R-s, Y., Z-y, Q., X-p, L., Y-h, L., Kuang, X., Zhang, Y., Liu, J., Yang, R.-S., Qiu, Z.-Y., Sun, J., Liao, X.-P., & Liu, Y.-H. (2022b). Molecular Epidemiology of New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Food-Producing Animals in China. *Front. Microbiol.*, 13, 912260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.912260>
- Wang, X., Dong, Z., Schwarz, S., Zhu, Y., Hua, X., X-m, C. W., Dong, Z., Schwarz, S., Zhu, Y., Hua, X., Zhang, Y., Liu, S., & W-j, Z. (2017). Plasmids of Diverse Inc Groups Disseminate the Fosfomycin Resistance Gene *fosA3* among *Escherichia coli* Isolates from Pigs, Chickens, and Dairy Cows in Northeast China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9), 1–6.
- Wang X, Zhao J, Ji F, Chang H, Qin J, Zhang C, Hu G, Zhu J, Yang J, Jia Z, Li G, Qin J, Wu B, Wang C. (2021) Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. *Front Microbiol.* 2021 Oct 27;12:754931. doi: 10.3389/fmicb.2021.754931
- Wang, Y., Batra, A., Schulenburg, H., & Dagan, T. (2022). Gene sharing among plasmids and chromosomes reveals barriers for antibiotic resistance gene transfer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377(1842). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0467>
- Watanabe, T. (1963). Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27(1), 87–115. <https://doi.org/10.1128/br.27.1.87-115.1963>
- Watnick, P. (2000). Biofilm , City of Microbes. *Society*, 182(10), 2675–2679.
- Weaver, C. A., Redborg, A. H., & Konisky, J. (1981). Plasmid-determined immunity of *Escherichia coli* K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein. *Journal of Bacteriology*, 148(3), 817–828. <https://doi.org/10.1128/jb.148.3.817-828.1981>
- Wei, B., Cha, S. Y., Shang, K., Zhang, J. F., Jang, H. K., & Kang, M. (2021). Genetic diversity of extended-spectrum cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and *E. coli* isolates in a single broiler chicken. *Veterinary Microbiology*, 254(February), 109010. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109010>

- Wein, T., & Dagan, T. (2020). Plasmid evolution. *Current Biology*, 30(19), R1158–R1163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.003>
- Wilke, M. S., Lovering, A. L., & Strynadka, N. C. J. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 525–533. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.08.016>
- Wolfgang, M. C., Anderson, G., Hassan, H. M., Nolan, L. K., Barbieri, N. L., Vande Vorde, J. A., Baker, A. R., Horn, F., Li, G., & Logue, C. M. (2017). FNR Regulates the Expression of Important Virulence Factors Contributing to the Pathogenicity of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | [Www.Frontiersin.Org](http://www.frontiersin.org), 1, 265. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00265>
- Wong, M. H., Xie, M., Xie, L., Lin, D., Li, R., Zhou, Y., Chan, E. W., & Chen, S. (2016). Complete sequence of a F33: A- B- conjugative plasmid carrying the oqxAB, fosA3, and blaCTX-M-55 elements from a Foodborne *Escherichia coli* strain. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01729>
- Wright, K. M., Crozier, L., Marshall, J., Merget, B., Holmes, A., & Holden, N. J. (2017). Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. *Microbial Biotechnology*, 10(3), 555–569. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12596>
- Wu, L., Chen, J., Wang, L., & Wu, Z. (2018). Whole genome sequence of an MCR-1-carrying, extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* ST746 isolate recovered from a community-acquired urinary tract infection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 13, 171–173. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.03.014>
- Wu, S., Tian, P., & Tan, T. (2022). Genomic landscapes of bacterial transposons and their applications in strain improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(19–20), 6383–6396. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12170-z>
- Xiang, D., Li, J., Sheng, Z., Yu, H., Deng, M., Bi, S., Hu, F., Chen, W., & Xue, X. (2016). Complete Sequence of a Novel IncR-F33 : A –: B – Plasmid , pKP1034. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1343–1348. <https://doi.org/10.1128/AAC.01488-15>.Address
- Xu, H., Miao, V., Kwong, W., Xia, R., & Davies, J. (2011). Identification of a novel fosfomycin resistance gene (fosA2) in *Enterobacter cloacae* from the Salmon River, Canada. *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 427–429. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03016.x>
- Xu, Z., Li, L., Shi, L., & Shirliff, M. E. (2011). Class 1 integron in staphylococci. *Molecular Biology Reports*, 38(8), 5261–5279. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0676-7>
- Yan, H., Chen, Y., Zhu, H., Huang, W. H., Cai, X. H., Li, D., Lv, Y. J., Si-Zhao, Zhou, H. H., Luo, F. Y., Zhang, W., & Li, X. (2022). The Relationship Among Intestinal Bacteria, Vitamin K and Response of Vitamin K Antagonist: A Review of Evidence and Potential Mechanism. *Frontiers in Medicine*, 9(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.829304>

- Yang, L., Mai, G., Hu, Z., Zhou, H., Dai, L., Deng, Z., & Ma, Y. (2023). Global transmission of broad-host-range plasmids derived from the human gut microbiome. *Nucleic Acids Research*, 51(15), 8005–8019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad498>
- Yang, M., Xu, G., Ruan, Z., & Wang, Y. (2022). Genomic Characterization of a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolate Co-Carrying blaNDM-5 and blaCTX-M-14 Genes Recovered from a Pediatric Patient in China. *Infection and Drug Resistance*, 15(November), 6405–6412. <https://doi.org/10.2147/IDR.S388797>
- Yang, Q. E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B. T., Fang, L. X., Liao, X. P., & Liu, Y. H. (2015). IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00964>
- Yang, T. Y., Lu, P. L., & Tseng, S. P. (2019). Update on fosfomycin-modified genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.10.006>
- Yasugi, M., Hatoya, S., Motooka, D., Matsumoto, Y., Shimamura, S., Tani, H., Furuya, M., Mie, K., Miyake, M., Nakamura, S., & Shimada, T. (2021). Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from companion dogs in Japan. In *PLoS ONE* (Vol. 16, Issue 2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246482>
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>
- Yoo, J. S., Kim, H. M., Koo, H. S., Yang, J. W., Yoo, J. Il, Kim, H. S., Park, H. K., & Lee, Y. S. (2013). Nosocomial transmission of NDM-1-producing *Escherichia coli* ST101 in a Korean hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(9), 2170–2172. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt126>
- Yoon, D., Moon, J. H., Cho, A., Boo, H., Cha, J. S., Lee, Y., & Yoo, J. (2023). Structure-Based Insight on the Mechanism of N-Glycosylation Inhibition by Tunicamycin. *Molecules and Cells*, 46(6), 337–344. <https://doi.org/10.14348/molcells.2023.0001>
- Yoon, E.-J., Gwon, B., Liu, C., Kim, D., Won, D., Park, S. G., Choi, J. R., & Jeong, S. H. (2020). Beneficial Chromosomal Integration of the Genes for CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for Stable Propagation. *American Society for Microbiology*, May, 1–13. <https://doi.org/DOI: 10.1128/mSystems.00459-20>
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Class D β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(4), 836–864. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa513>
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., & Popowska, M. (2021). Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Animal Manure – Consequences of Its Application in Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 12(March). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>

- Zhang, L. J., Gu, X. X., Zhang, J., Yang, L., Lu, Y. W., Fang, L. X., & Jiang, H. X. (2020). Characterization of a fosA3 Carrying IncC–IncN Plasmid From a Multidrug-Resistant ST17 *Salmonella* Indiana Isolate. *Frontiers in Microbiology*, 11(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01582>
- Zhang, L. J., Yang, J. T., Chen, H. X., Liu, W. Z., Ding, Y. L., Chen, R. A., Zhang, R. M., & Jiang, H. X. (2023). F18:A-B1 Plasmids Carrying blaCTX-M-55 Are Prevalent among *Escherichia coli* Isolated from Duck–Fish Polyculture Farms. *Antibiotics*, 12(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12060961>
- Zhang, R., Liu, L., Zhou, H., Chan, E. W., Li, J., Fang, Y., Li, Y., Liao, K., & Chen, S. (2017). Nationwide Surveillance of Clinical Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Strains in China. *EBioMedicine*, 19, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.032>
- Zhang, S., Abbas, M., Rehman, M. U., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Zhu, D., Zhao, X., Gao, Q., Tian, B., & Cheng, A. (2021). Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. *Science of the Total Environment*, 799, 149280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149280>
- Zhang, X., Ma, M., Cheng, Y., Huang, Y., Tan, Y., Yang, Y., Qian, Y., Zhong, X., Lu, Y., & Si, H. (2022). Spread and Molecular Characteristics of Enterobacteriaceae Carrying fosA -Like Genes from Farms in China . *Microbiology Spectrum*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00545-22>
- Zheng, X. R., Sun, Y. H., Chang, M. X., & Jiang, H. X. (2022). Plasmid and chromosomal copies of blaCMY-2 mediate resistance to third-generation cephalosporins in *Escherichia coli* from food animals in China. *Veterinary Microbiology*, 271(August 2021), 109493. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109493>
- Zhou, F., Wang, D., Hu, J., Zhang, Y., Tan, B. K., & Lin, S. (2022). Control Measurements of *Escherichia coli* Biofilm: A Review. *Foods*, 11(16), 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods11162469>
- Zhou, M., Guo, Z., Yang, Y., Duan, Q., Zhang, Q., Yao, F, Zhu, J, Zhang, X., Hardwidge, P. R., & Zhu, G. (2014). Flagellin and F4 fimbriae have opposite effects on biofilm formation and quorum sensing in F4ac+ enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 168(1), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.014>
- Zurfluh, K., Treier, A., Schmitt, K., & Stephan, R. (2020). Mobile fosfomycin resistance genes in Enterobacteriaceae—An increasing threat. *MicrobiologyOpen*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1135>

11. ANEXOS

Anexo S1. Genomas de *Escherichia coli* ST131 depositados en *GenBank* hasta 2022.

Nombre de la cepa	Ensamble	Número de acceso (cromosoma)	Clado	Bioproject	Base de datos	Biosample	Fecha de colección	Localización	Tipo de muestra	Fuente	Serotipo	Variante FimH
E302	GCA_010725305.1	AP022362.1	C0	PRJDB6565	NCBI Refseq	SAMD00186874	2015	Japón	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
Ecol_745	GCA_001618345.2	CP015074.2	A	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN04590095	2012	Marruecos	Clinica	No especificado	O153:H5	41
Z247	GCA_002142715.1	CP021207.1	B	PRJNA386074	NCBI Refseq	SAMN06925129	2015	China	Clinica	Sangre	O25:H4	161
p4A	GCA_011331215.2	CP049085.2	C2b	PRJNA603908	NCBI Refseq	SAMN13948677	2015	USA	Clinica	Sangre	O25:H4	30
S21EC	GCA_018972225.1	CP076689.1	B	PRJNA737575	NCBI Refseq	SAMN19700015	2009	Reino Unido	Clinica	No especificado	O25:H4	22
Dog168	GCA_019428525.1	CP080116.1	C2a	PRJNA748602	NCBI Refseq	SAMN20339880	2009	Kenia	Animal	Heces de perro	O25:H4	30
M70	GCA_019428565.1	CP080118.1	C2a	PRJNA748602	NCBI Refseq	SAMN20339878	2010	República Checa	Clinica	Orina	O25:H4	30
M45	GCA_019428585.1	CP080119.1	C2a	PRJNA748602	NCBI Refseq	SAMN20339877	2010	República Checa	Clinica	Orina	O25:H4	30
M24	GCA_019428605.1	CP080120.1	C2a	PRJNA748602	NCBI Refseq	SAMN20339876	2009	República Checa	Clinica	Orina	O25:H4	30
BR43-DEC	GCA_004118895.1	CP035377.1	C1	PRJNA511007	NCBI Refseq	SAMN10748606	2015	Brasil	Clinica	Orina	O25:H4	30
SA186	GCA_003856995.1	CP022730.1	B	PRJNA395653	NCBI Refseq	SAMN07411973	2012	Arabia Saudita	Clinica	Orina	O25:H4	22
AR_0089	GCA_003571825.1	CP032265.1	B	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014930	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	22
Ecol_244	GCA_002012305.1	CP019020.1	B	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511157	2010	Argentina	Clinica	No especificado	O25:H4	22
THO-003	GCA_015138575.1	AP022525.1	C2b	PRJDB9036	NCBI Refseq	SAMD00196001	2018	Japón	Ambiental	Aguas residuales	O25:H4	30
AR_451	GCA_003288455.1	CP030337.1	C1	PRJNA316321	NCBI Refseq	SAMN07291544	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
RHBSTW-00482	GCA_013748455.1	CP056470.1	C2b	PRJNA605147	Genbank	SAMN15148629	2017	Reino Unido	Ambiental	Aguas residuales	O25:H4	30
RHBSTW-00081	GCA_013795795.1	CP056873.1	C2b	PRJNA605147	Genbank	SAMN15148474	2017	Reino Unido	Ambiental	Aguas residuales	O25:H4	30
O25b:H4-ST131	GCA_015277555.1	CP063774.1	C1	PRJNA670813	NCBI Refseq	SAMN16520835	2018	Hong Kong	Ambiental	Aguas residuales	O25:H4	30
Ecol_AZ146	GCA_002012085.1	CP018991.1	C2b	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511152	2012	Italia	Clinica	No especificado	O25:H4	30
pA11	GCA_011330935.2	CP049077.2	C2b	PRJNA603908	NCBI Refseq	SAMN13948684	2015	USA	Clinica	Sangre	O25:H4	30
FDAARGOS_1265	GCA_016890045.1	CP069583.1	C2b	PRJNA231221	NCBI Refseq	SAMN16357407	No disponible	USA	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
SCAID WND1-2021	GCA_019915525.1	CP082831.1	C2b	PRJNA754843	NCBI Refseq	SAMN20982447	2021	Kazajistán	Clinica	Dercarga de herida	O25:H4	30
F17EC0098	GCA_021130495.1	CP088356.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391703	2017	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30

Nombre de la cepa	Ensamble	Número de acceso (cromosoma)	Clado	Bioproject	Base de datos	Biosample	Fecha de colección	Localización	Tipo de muestra	Fuente	Serotipo	Variante FimH
F16EC0507	GCA_021130695.1	CP088393.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391692	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
F16EC0342	GCA_021130865.1	CP088413.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391686	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
F16EC0121	GCA_021131025.1	CP088451.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391678	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
C17EC0083	GCA_021132115.1	CP088629.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391614	2017	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
B16EC0725	GCA_021132975.1	CP088776.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391567	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
F16EC0653	GCA_021365955.1	CP088879.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391700	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
TO217	GCA_900520365.1	LS992192.1	C2b	PRJEB27475	NCBI Refseq	SAMEA4830526	2018	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
Ecol_867	GCA_002012205.1	CP018983.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511148	2013	Canadá	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_AZ153	GCA_002012245.1	CP019000.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511160	2013	China	Clinica	No especificado	O25:H4	30
4/1/2001	GCA_003856695.1	CP023844.1	C2a	PRJNA413669	NCBI Refseq	SAMN07760931	2009	Suecia	Clinica	Heces	O25:H4	30
CCUG 73778	GCA_009577985.1	CP041337.1	C0	PRJNA305687	NCBI Refseq	SAMN12169096	2008	Suecia	Clinica	Sangre	O25:H4	30
THO-015	GCA_015139735.1	AP022549.1	C1	PRJDB9036	NCBI Refseq	SAMD00196013	2018	Japón	Clinica	Orina	O25:H4	30
2019_APHA	GCA_014217135.1	CP051609.1	C1	PRJNA625187	NCBI Refseq	SAMN14594835	2019	Reino Unido	Animal	Cerdo, cecal	O25:H4	30
2017_APHA	GCA_014217155.1	CP051615.1	C1	PRJNA625187	NCBI Refseq	SAMN14594834	2017	Reino Unido	Animal	Cerdo, cecal	O25:H4	30
EcPF18	GCA_013372325.1	CP054219.1	C1	PRJNA636382	NCBI Refseq	SAMN15075997	2018	USA	Clinica	Orina	O25:H4	30
Ecol_448	GCA_001618365.1	CP015076.1	A	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN04590097	2011	Argentina	Clinica	No especificado	O16:H5	41
O25b:H4	GCA_001874485.1	CP015085.1	C2	PRJNA316859	NCBI Refseq	SAMN04605558	2014	Arabia Saudita	Clinica	Orina	O25:H4	1196
MNCRE44	GCA_000931565.1	CP010876.1	C1	PRJNA272863	NCBI Refseq	SAMN03287565	2012	USA	Clinica	Espujo	O25:H4	30
ZH193	GCA_001566675.1	CP014497.1	C1	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381846	2004	No disponible	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_743	GCA_001618325.1	CP015069.1	A	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN04590096	2012	Emiratos Árabes	Clinica	No especificado	O25:H4	1426
Ecol_732	GCA_001617565.1	CP015138.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN04621897	2012	Tailandia	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_276	GCA_002011965.1	CP018953.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511184	2010	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_542	GCA_002012025.1	CP018970.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511186	2011	Vietnam	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_AZ161	GCA_002012265.1	CP019012.1	C1	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511166	2013	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
81009	GCA_002157245.1	CP021179.1	C1	PRJNA383781	NCBI Refseq	SAMN06808253	2009	Emiratos Árabes	Clinica	Orina	O25:H4	30
4_4	GCA_003856655.1	CP023826.1	C1	PRJNA413669	NCBI Refseq	SAMN07760938	2009	Suecia	Clinica	Heces	O25:H4	30
E41-1	GCA_003194345.1	CP028483.1	C1	PRJNA431043	NCBI Refseq	SAMN08382661	2017	China	Clinica	Espujo	O16:H5	30

Nombre de la cepa	Ensamble	Número de acceso (cromosoma)	Clado	Bioproject	Base de datos	Biosample	Fecha de colección	Localización	Tipo de muestra	Fuente	Serotipo	Variante FimH
U12A	GCA_004141955.1	CP035476.1	C1	PRJNA516746	NCBI Refseq	SAMN10817475	2012	USA	Clinica	Orina	O25:H4	30
U13A	GCA_004135165.1	CP035477.1	C1	PRJNA516747	NCBI Refseq	SAMN10817700	2013	USA	Clinica	Orina	O25:H4	30
U14A	GCA_004135915.1	CP035516.1	C1	PRJNA516748	NCBI Refseq	SAMN10836813	2015	USA	Clinica	Orina	O25:H4	30
S65EC	GCA_004299805.1	CP036245.1	C2	PRJNA517996	NCBI Refseq	SAMN10879429	2009	Australia	Clinica	Orina	O25:H4	30
S103EC	GCA_018972265.1	CP076693.1	C0	PRJNA737575	NCBI Refseq	SAMN19700014	2010	Australia	Clinica	No especificado	O25:H4	30
MVAST0167	GCA_001566655.1	CP014492.1	A	PRJNA307507	Genbank	SAMN04381852	2010	USA	Clinica	No especificado	O16:H5	41
JJ1886	GCA_000493755.1	CP006784.1	C2	PRJNA218163	NCBI Refseq	SAMN02603887	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
JJ2434	GCA_001513635.1	CP013835.1	C2a	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381854	2008	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_656	GCA_002012065.1	CP018979.1	C2a	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511161	2012	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
Ecol_AZ162	GCA_002012165.1	CP019015.1	C2a	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511185	2013	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
AR_0104	GCA_002056635.1	CP020116.1	C1	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014945	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
AR_0055	GCA_002202175.1	CP021935.1	C2	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014896	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
Apr-00	GCA_003856615.1	CP023849.1	C2a	PRJNA413669	NCBI Refseq	SAMN07760930	2009	Suecia	Clinica	Orina	O25:H4	30
AR_0081	GCA_002996945.1	CP027534.1	C1	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014922	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
U15A	GCA_004193755.1	CP035720.1	C1	PRJNA516749	NCBI Refseq	SAMN10837069	2015	USA	Clinica	Orina	O25:H4	30
S10EC	GCA_018972245.1	CP076697.1	C2a	PRJNA737575	NCBI Refseq	SAMN19700013	2009	Reino Unido	Clinica	No especificado	O25:H4	30
EC958	GCA_000285655.3	HG941718.1	C2a	PRJEA61443	NCBI Refseq	SAMEA2272019	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
B36	GCA_900622635.1	LR130545.1	C2a	PRJEB29930	NCBI Refseq	SAMEA5128441	No disponible	Australia	Clinica	Sangre	O25:H4	30
JJ1887	GCA_001593565.1	CP014316.1	C0	PRJNA311313	NCBI Refseq	SAMN04481707	2007	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	30
CD306	GCA_001513615.1	CP013831.1	C0	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381845	2002	USA	Animal	Heces de gato	O25:H4	30
G749	GCA_001566635.1	CP014488.1	B	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381851	2010	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	22
H105	GCA_002193095.1	CP021454.1	C1	PRJNA387731	NCBI Refseq	SAMN07162922	No disponible	Alemania	Clinica	Exudado vaginal	O25:H4	30
AR_0058	GCA_002180195.1	CP021689.1	C1	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014899	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
AR_0086	GCA_003571665.1	CP032201.1	C1	PRJNA292904	NCBI Refseq	SAMN04014927	No disponible	No disponible	Sin datos	Sin datos	O25:H4	30
JJ1897	GCA_001513655.1	CP013837.1	B	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381850	2004	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	22
Ecol_AZ159	GCA_002012145.1	CP019008.1	B	PRJNA316786	NCBI Refseq	SAMN05511159	2013	Colombia	Clinica	No especificado	O25:H4	22
5_1	GCA_021228975.1	CP089445.1	C0	PRJNA787313	NCBI Refseq	SAMN23798050	2021	China	Clinica	Fluidos humanos	O25:H4	30

Nombre de la cepa	Ensamble	Número de acceso (cromosoma)	Clado	Bioproject	Base de datos	Biosample	Fecha de colección	Localización	Tipo de muestra	Fuente	Serotipo	Variante FimH
uk_P46212	GCA_001469815.1	CP013658.1	C2a	PRJNA297860	NCBI Refseq	SAMN04159541	2005	Reino Unido	Clinica	Orina	O25:H4	30
FDAARGOS_144	GCA_002944935.1	CP014111.1	B	PRJNA231221	NCBI Refseq	SAMN03996288	2014	USA	Clinica	Orina	O13:H4	410
SaT040	GCA_001566615.1	CP014495.1	B	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381849	2007	USA	Clinica	No especificado	O25:H4	22
ZH063	GCA_001577325.1	CP014522.1	B	PRJNA307507	NCBI Refseq	SAMN04381853	2002	Canadá	Clinica	No especificado	O25:H4	22
DA33135	GCA_003181035.1	CP029576.1	A	PRJNA472712	NCBI Refseq	SAMN09245744	No disponible	Suecia	Clinica	No especificado	O25:H4	30
S22EC	GCA_018972205.1	CP076687.1	B	PRJNA737575	NCBI Refseq	SAMN19700016	2009	Reino Unido	Clinica	No especificado	O25:H4	22
D16EC0589	GCA_021131895.1	CP088596.1	C2b	PRJNA782071	Genbank	SAMN23391627	2016	Corea del Sur	Clinica	Sangre	O25:H4	30
Eco-15	GCA_015910185.1	CP047710.1	A	PRJNA599404	NCBI Refseq	SAMN13747522	2015	Canadá	Clinica	Toma rectal	O16:H5	30
2_0	GCA_003856635.1	CP023853.1	C0	PRJNA413669	NCBI Refseq	SAMN07760925	2009	Suecia	Clinica	Orina	O25:H4	30

Anexo S2. Medio Mínimo Esencial (D5F)

Reactivo	1000 ml	250 ml
DMEM	13.77g	3.34g
L-arginina	0.116g	0.029g
L-asparagina	0.036g	0.009g
NAHCO ₃	2g	0.5g
Piruvato	10ml	2.5ml
L-glutamina	7.5ml	1.875ml
Penicilina-Estreptomicina	10ml	2.5ml
Suero Fetal Bovino (SFB)	50ml	12.5ml

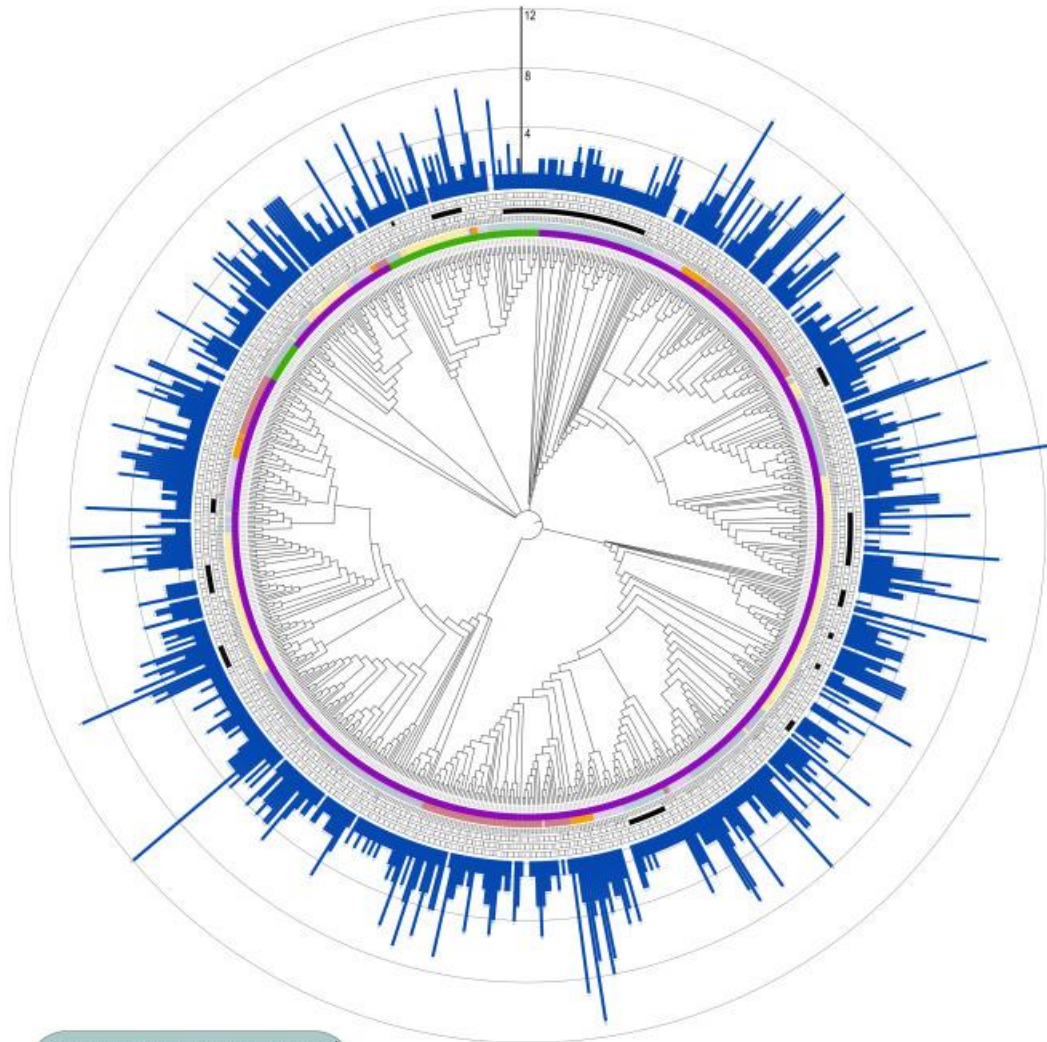
Anexo S3. Resultados del análisis de enriquecimiento para ST, genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos (Simulación de Monte Carlo).

Secuencia tipo (STs)	
Número de STs identificados en plásmidos alimentarios	48
Número de STs compartidos entre plásmidos alimentarios y clínicos	16
Iteraciones	1000
Promedio	19
Probabilidad \geq 16	0.015
Genes de resistencia	
Número de genes de resistencia en plásmidos alimentarios	62
Número de genes de resistencia compartidos entre plásmidos alimentarios y clínicos	51
Iteraciones	1000
Promedio	33
Probabilidad \geq 51	0.001
Genes de virulencia	
Número de genes de resistencia en plásmidos alimentarios	38
Número de genes de resistencia compartidos entre plásmidos alimentarios y clínicos	33
Iteraciones	1000
Promedio	28
Probabilidad \geq 33	0.001

Anexo S4. 33 genes de virulencia presentes en plásmidos de origen alimentarios y plásmidos de origen clínico.

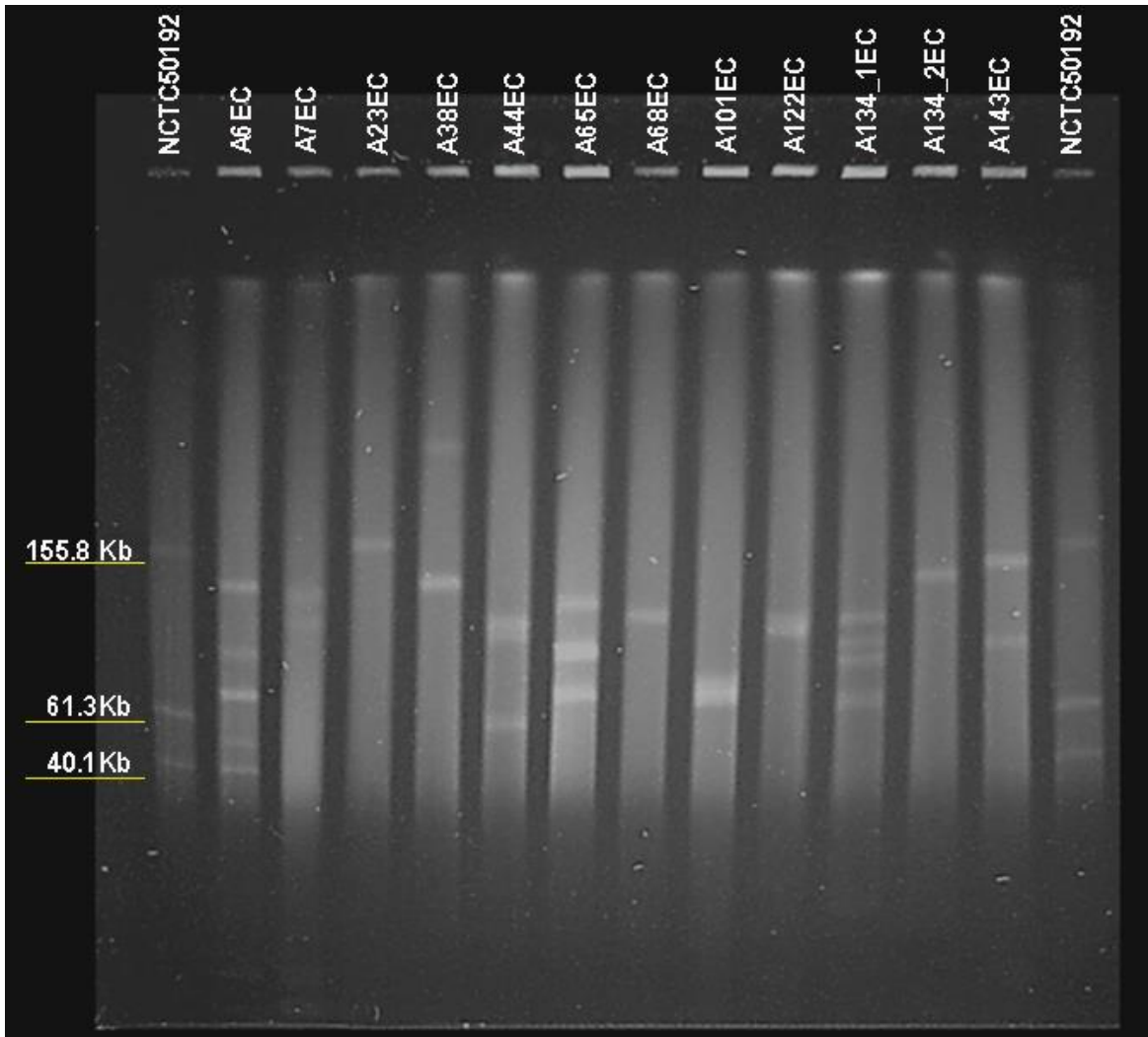
Genes	Función del factor de virulencia
<i>afaD</i>	Este gen es uno de los componentes de los operones <i>afa</i> que están involucrados en la adhesión bacteriana, un factor crucial para la capacidad de la bacteria de infectar a su hospedador y causar enfermedad.
<i>astA</i>	Enterotoxina (astatoquina) responsable de la alteración de la función normal de las células intestinales en el hospedador.
<i>cba</i>	Codifica para una proteína Cba que es una adhesina que facilita la adherencia de la bacteria a las células del hospedador.
<i>cdtB</i>	Codifica una subunidad de una toxina llamada toxina cdt que significa toxina citotóxica distensora.
<i>cea</i>	Enterotoxina CEA actúa en el intestino del hospedador, donde puede alterar la integridad de las células epiteliales.
<i>celb</i>	Codifica una celulasa, que permite la descomposición de la celulosa en el ambiente del tracto gastrointestinal; aunque no interactúa directamente con las células humanas, la actividad de la celulasa de <i>E. coli</i> podría contribuir indirectamente a la adaptación y supervivencia de la bacteria en el intestino.
<i>cia</i>	Codifica una proteína de invasión que facilita la entrada de la bacteria en las células del hospedador.
<i>cib</i>	Está relacionado con la invasión celular y el daño a los tejidos, permitiendo que las cepas de <i>E. coli</i> .
<i>cma</i>	Codifica una proteína que se denomina CMA (Campylobacter mucinase o mucina). Descompone la mucina, que es una proteína compleja que forma parte de la capa mucosa que recubre las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
<i>cvaC</i>	Codifica una proteína conocida como CvaC (Campylobacter virulence-associated protein C). Implicada en la formación del sistema de cápsula de la bacteria.
<i>ehxA</i>	Codifica una toxina enterohemorrágica A (EhxA), que es una exotóxica responsable de causar daño a las células endoteliales (que recubren los vasos sanguíneos).
<i>epeA</i>	Codifica para EPEC adherence factor A (EpeA), una proteína que permite a bacterias patógenas adherirse a las células epiteliales del intestino del hospedador, facilitando la colonización intestinal.
<i>espP</i>	Codifica la proteína EspP, que es una proteasa secretada por <i>E. coli</i> que actúa sobre las proteínas del hospedador modificando las funciones celulares del hospedador durante la infección.
<i>etpD</i>	Codifica la proteína EtpD, que es parte del sistema de secreción tipo III (T3SS), que permite a la bacteria inyectar proteínas efectoras.
<i>etsC</i>	Codifica una proteína involucrada en el sistema de secreción tipo III (T3SS), que permite a la bacteria inyectar proteínas efectoras principalmente en los patotipos EPEC y EHEC.
<i>hlyF</i>	Codifica una proteína llamada HlyF, que está involucrada en la producción de hemolisinas

<i>iha</i>	Codifica para la proteína Iha, que funciona como adhesina y receptor de hierro, un nutriente esencial para su supervivencia.
<i>iroN</i>	Codifica para una proteína de receptor de hierro llamada IroN, que es una siderofora (o receptor de hierro) situada en la superficie bacteriana.
<i>iss</i>	Factor de virulencia involucrado en la captación de hierro desde el hospedador.
<i>iucC</i>	Codifica para la proteína IucC, que forma parte la producción y liberación de un sideróforo como aerobactina.
<i>iutA</i>	Codifica una proteína receptora llamada IutA, que es un receptor de sideróforo.
<i>katP</i>	Codifica para la catalasa KatP, que descompone el peróxido de hidrógeno que le permite resistir el estrés oxidativo y evadir las defensas del sistema inmune.
<i>mchF</i>	Codifica para la proteína MchF, que está involucrada en la producción de colicina M, una toxina que permite a <i>E. coli</i> competir con otras bacterias al destruir sus membranas celulares.
<i>nleA</i>	La proteína NleA se encuentra en el sistema de secreción tipo III (T3SS), que permite inyectar proteínas efectoras en las células del hospedador.
<i>ompT</i>	Codifica para una proteína OmpT, que es una proteasa tipo serina que se encuentra en la membrana externa de la bacteria.
<i>sepA</i>	Codifica para una proteasa SepA que degrada proteínas del hospedador e interfiere con la respuesta inmune liberandola al espacio extracelular.
<i>sitA</i>	Codifica para la proteína SitA, que es parte del sistema de transporte de hierro Sit
<i>sta1</i>	Codifica para la toxina STa (Toxina Termoestable A), esta toxina es una pequeña proteína que tiene la capacidad de inducir diarrea acuosa en los humanos y otros animales.
<i>subA</i>	Codifica para una toxina SubA, que tiene propiedades enzimáticas y actúa sobre las células afectando la función celular en el intestino del hospedador.
<i>terC</i>	Codifica para una proteína involucrada en la captación de hierro en algunas cepas de <i>Escherichia coli</i> , especialmente en <i>E. coli</i> uropatogénica (UPEC)
<i>toxB</i>	Codifica la toxina ToxB secretada por algunas cepas de <i>E. coli</i> y se cree que tiene un papel en la alteración de la función celular y en la disfunción de la mucosa intestinal durante la infección.
<i>traT</i>	Codifica la proteína TraT, que participa en la evasión del sistema inmune del hospedador, inhibiendo la activación del sistema del complemento y ayuda a la bacteria a evadir la fagocitosis.
<i>tsh</i>	Codifica para una toxina conocida como TSH (Toxina de Superficie de Hemaglutinina), una hemaglutinina con la capacidad de aglutinar glóbulos rojos, aunque su papel principal está en la interacción con las células del hospedador.

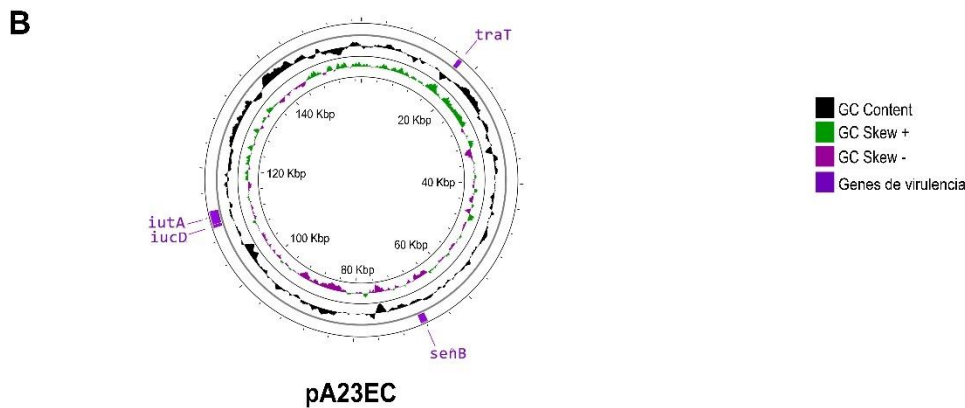
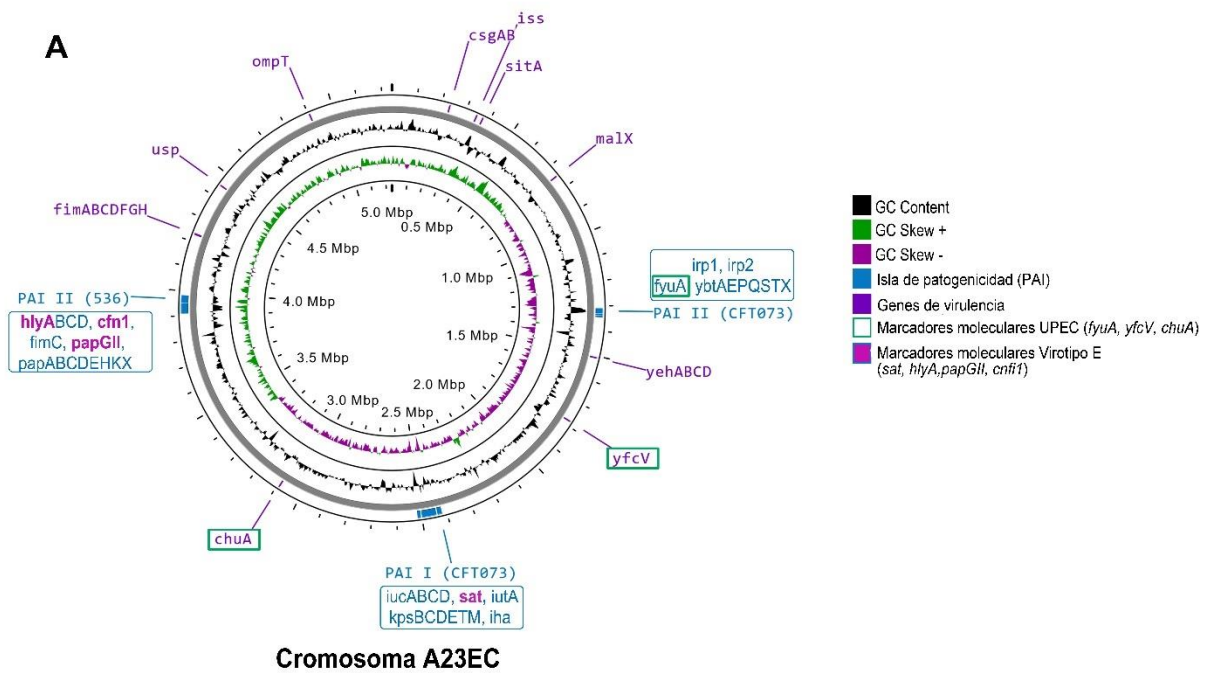


- Círculos (de adentro a afuera)**
1. Fuente (alimentos o clínicos)
 2. Filogrupo
 3. Secuenciotipo
 4. ST11
 5. ST10
 6. ST410
 7. Número de copias

Anexo S5. Relación filogenética de genomas alimentarios y clínicos. Los genomas de cepas de *E. coli* incluidas en este estudio (77 de genomas de fuentes alimentarias y 649 de fuentes clínicas) se muestran como un cladograma. Esta representación gráfica se generó utilizando la plataforma CSI Phylogeny, con *Escherichia coli* K-12 (NC_000913.3) como genoma de referencia. Los ST11, ST10 y ST410 muestran en la figura porque fueron los secuenciotipos más prevalentes en ambos conjuntos de datos.



Anexo S6. Perfil plasmídico de las cepas de *E. coli* obtenido mediante PFGE+S1. A la izquierda se muestran los tamaños de tres de los plásmidos que porta la cepa control NCTC 50192



Anexo S7. Viruloma de *E. coli* A23EC. (A) Viruloma cromosómico. Se muestran las tres islas de patogenicidad PAI I identificadas en A23EC. Los genes de virulencia que se encuentran en cada PAI se enumeran en cuadros azules. Los genes que definen el virotipo E, todos ellos presentes en estos PAI, se destacan en **negrita** y en **rosa**. **(B) Viruloma del plásmido (pA23EC).**

Anexo S9. Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana para las cepas de *E. coli* A65EC y A134EC

Antibiótico (Clase)	Abreviaturas	Concentración (µg)	A65EC	A134_1EC
Amikacina (A)	AN	30	I	I
Gentamicina (A)	GM	10	I	R
Streptomycin (A)	S	10	R	R
Tobramicina (A)	NN	10	I	R
Ampicillina (P)	AM	10	R	R
Amoxicillina /ácido clavulánico (P)	AMC	20/10	R	R
Cefuroxima (C)	CXM	30	R	R
Cefotaxima (C)	CTX	30	R	R
Ceftazidima (C)	CAZ	30	R	R
Cefepima (C)	FEP	30	SDD	SDD
Cefoxitina (C)	FOX	30	R	R
Aztreonam (M)	ATM	30	R	R
Trimetoprim (FI)	TMP	5	R	R
Trimetoprim / sulfametoxazol (FI)	SXT	1.25/23.75	R	R
Ácido nalidíxico (Q)	NA	30	S	R
Ciprofloxacino (F)	CIP	5	S	R
Cloramfenicol (Ph)	C	30	I	R
Tetraciclina (T)	TET	30	R	R
Meropenem (Ca)	MEM	10	S	S
Imipenem (Ca)	IMP	10	S	S
Fosfomicina (Pho) /G6P	FOS	200/50	S	R

R, resistente

I, intermedio

S, sensible

SDD, sensible dependiente de la dosis

Clase A: Aminoglucósidos, Clase B: b-lactámicos, Clase C: Cefalosporina, Clase Ca: Carbapenémicos, Clase F: Fluoroquinolonas, Clase FI: Inhibidores del folato, Clase M: Monobactam, Clase P: Penicilinas, Clase Ph: Fenicoles, Clase Q: Quinolonas, Clase T: Tetraciclina y Clase Pho: Fosfónico.

12. ACTIVIDADES DESARROLLADAS DURANTE EN DOCTORADO

12.1 Publicaciones derivadas de esta tesis

Balbuena-Alonso, M. G., Camps, M., Cortés-Cortés, G., Carreón-León, E. A., Lozano-Zarain, P., & Rocha-Gracia, R. D. C. (2023). Strain belonging to an emerging, virulent sublineage of ST131 *Escherichia coli* isolated in fresh spinach, suggesting that ST131 may be transmissible through agricultural products. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1237725. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1237725>. PMID: 37876872 PMCID: PMC10591226

Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., & Del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid*, 123-124, 102650. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>. PMID: 36130651 PMCID: PMC10896638.

12.2 Colaboración en publicaciones.

Montenegro, D., Cortés-Cortés, G., **Balbuena-Alonso M. G.**, Warner, C., Camps, M. (2024) Wolbachia-based emerging strategies for control of vector-transmitted disease. *Acta Tropica*. 260, 107410. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107410>

Babines-Orozco, L., **Balbuena-Alonso, M. G.**, Barrios-Villa, E., Lozano-Zarain, P., Martínez-Laguna, Y., Rocha-Gracia, R., & Cortés-Cortés, G. (2024). Antimicrobial resistance in food-associated *Escherichia coli* in Mexico and Latin America. *Bioscience of microbiota, food, and health*, 43(1), 4–12. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2023-022>.

Lima-Becerra, I.; **Balbuena-Alonso, M.G.**; Dorantes-Campuzano, F.; Mojica, L.; Loarca-Piña, G.; Morales-Sánchez, E.; Ramírez-Jiménez, A.K.; Gaytán-Martínez, M. (2021). Ohmic Heating as an Emerging Technology for the Improvement of the Techno-Functional Properties of Common Bean Flour. *Biol. Life Sci. Forum* 2021, 6, 95. <https://doi.org/10.3390/Foods2021-11000>

12.3 Registros en el NCBI

Balbuena-Alonso, M.G., Rocha-Gracia, R.D.C., Lozano-Zarain, P., Cortés-Cortés, G., Carreón-León, E. and Camps, M. First identification of a potentially uropathogenic ST131 strain of *Escherichia coli*, harboring chromosomal aac(6')-Ib-cr/ blaOXA-1/catB3/acc(3')-Ile/blaCTX-M-15 resistance genes, isolated from spinach. BioProject: PRJNA936840. BioSample: SAMN33377322. GenBank: CP118558.1.

Balbuena-Alonso,M.G., Rocha-Gracia,Rd.C., Lozano-Zarain,P., Cortes-Cortes,G., Carreon-Leon, M. Plasmid-mediated cephalosporin resistance in CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from ready-to-eat cilantro. BioProject: PRJNA936840. BioSample: SAMN33378722.

Balbuena-Alonso,M.G., Rocha-Gracia,Rd.C., Lozano-Zarain,P., Cortes-Cortes,G., Carreon-Leon. Plasmid-mediated cephalosporin resistance in CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from ready-to-eat cilantro. BioProject: PRJNA936840. BioSample: SAMN33388322.

12.4 Premios autor principal

Segundo lugar. en el 11th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2024 en la modalidad de Póster con el trabajo titulado. Characterization of biofilm-producing *E. coli* ST131 with uropathogenic potential, associated with carbapenem resistance, isolated from spinach. 12 al 15 de noviembre de 2024. Puebla, México

Tercer lugar en el 3er concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP por el trabajo titulado “*Escherichia coli*: ¿Amiga o Enemiga?”. 29 de octubre de 2022.

Tercer lugar “Premio Jesús Kumate” en el XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en modalidad Póster con el trabajo titulado “Caracterización de *E. coli* ST131 con potencial uropatogénico, asociadas a la resistencia a carbapenémicos aisladas de espinaca”. 22 al 25 de mayo de 2024. Puebla, México

Primer lugar en el 10th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022 en la modalidad de Póster con el trabajo titulado “Genomic characterization of multidrug-resistant *E. coli* strains isolated from fresh vegetables in Puebla, Mexico”. 16 al 18 de noviembre 2022. Puebla, México.

Primer lugar en el 10th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022 en la modalidad de Oral con el trabajo titulado “Comparative genomic análisis of phylogeny, resistome and virulome and *E. coli* food and clinical source”. 16 al 18 de noviembre 2022. Puebla, México.

Mención honorífica en el primer concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP por el trabajo titulado “Hablemos Claro: Resistencia bacteriana a los antibióticos”. 14 de octubre de 2022.

Segundo Lugar en el Congreso XLV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica en Modalidad Póster con el trabajo titulado “Análisis de la filogenia, resistoma y viruloma de genomas de *Escherichia coli* de origen clínico”. 28 de mayo al 4 de junio de 2021.

12.4.1 Premios como coautor

Primer lugar en el 11th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022 en la modalidad de póster con el trabajo titulado “Analysis of plasmids in fosfomycin- and colistin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from meat products”. 12 al 15 de noviembre 2024. Puebla, México.

Segundo lugar en el Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos en la modalidad de póster con el trabajo titulado “Estudio de clonalidad de cepas de *E. coli* multidrogoresistentes, aisladas de biopsias de un paciente con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. Modalidad Póster. 22 y 23 de noviembre 2023. Puebla, México

Segundo lugar en el 9th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022 en la modalidad de póster con el trabajo titulado “Application emerging for the improvement of the techno-funtional properties of common bean flour”. 11 al 13 de noviembre 2020. Puebla, México.

12.5 Presentaciones en congresos como autor principal

1. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Manel Camps, Gerardo Cortés Cortés, Edwin Barrios Villa, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. Characterization of biofilm-producing *E. coli* ST131 with uropathogenic potential, associated with carbapenem resistance, isolated from spinach. Modalidad Oral. 11th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2024. 12 al 15 de noviembre 2022. Puebla, México.

2. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Manel Camps, Gerardo Cortés Cortés, Eder Alejandro Carreón León, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Caracterización de *E. coli* ST131 con potencial uropatogénico, asociadas a la resistencia a carbapenémicos aisladas de espinaca”. XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 22 al 25 de mayo de 2024. Puebla, México.

3. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Eder A. Carreón León, Edwin Barrios Villa, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Characterization of biofilm-forming multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from vegetables and meat products”. Modalidad Póster. VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. 8 al 12 de octubre de 2023. San Miguel de Allende, Guanajuato, México.

4. **Maria Guadalupe Balbuena-Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Eder Alejandro Carreón León, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. “*Escherichia coli* en alimentos frescos: un reservorio de genes de virulencia y resistencia a antibióticos”.

Modalidad Póster. 4to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXV Semana del Química, 2022. 28 de noviembre al 1 de diciembre 2022. H. Caborca, Sonora.

5. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. "Genomic characterization of multidrug-resistant *E. coli* strains isolated from fresh vegetables in Puebla, Mexico". Modalidad Póster. 10th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022. 16 al 18 de noviembre 2022. Puebla, México.

6. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Manel Camps, Jay Kim, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. "Comparative genomic análisis of phylogeny, resistome and virulome and *E. coli* food and clinical source". Modalidad Oral. 10th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022. 16 al 18 de noviembre 2022. Puebla, México.

7. **Maria Guadalupe Balbuena-Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Patricia Lozano Zarain, Eder Alejandro Carreón León, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. "Caracterización genómica de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales frescos, recolectados en Puebla, México". XLVI Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 25 al 28 de mayo de 2022. San Luis Potosi, México.

8. **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**. Presentación oral "*Escherichia coli* en alimentos: un importante reservorio de genes de virulencia y resistencia a antibióticos" en la I Reunión de la Red CYTED // in the 1st CYTED meeting: Resistencia a Antibióticos en Microorganismos Ec ESKAPE: comparación pre y post-COVID-19 (P220RT0168). 19 de abril del 2022, Lima, Perú.

9. **Maria Guadalupe Balbuena-Alonso**, Gerardo Cortés-Cortés, Manel Camps, Jay Kim, Patricia Lozano-Zarain, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. "Análisis genómico comparativo de la filogenia, resistoma y viruloma en *E. coli* de origen alimentario y clínico". Modalidad Oral. XIX Jornadas Argentinas de Microbiología. 6 y 7 de octubre 2021. Buenos Aires, Argentina.

10. **Maria Guadalupe Balbuena-Alonso**, Gerardo Cortés-Cortés, Manel Camps, Jay Kim, Patricia Lozano-Zarain, Margarita Ma. de la Paz Arenas-Hernandez, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. "Análisis genómico del resistoma y viruloma en *E. coli* de origen alimentario y su potencial transferencia horizontal". Modalidad Oral. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021. 25 al 28 agosto 2021. Asunción, Paraguay.

11. **Maria G Balbuena Alonso**, **Gerardo Cortés Cortés**, Manel Camps, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. "Análisis de la filogenia, resistoma y viruloma de genomas de *Escherichia coli* de origen clínico". Modalidad Póster. XLV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 28 de mayo al 4 de junio de 2021.

12.6 Presentaciones en Congresos como coautor

1. José de Jesús García Pérez, **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Identification and characterization of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases isolated from fresh cilantro” 11th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022. 13 al 15 de noviembre de 2024.
2. Lorena Babines Orozco, Gerardo Cortés Cortés, **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Ygnacio Martínez Laguna. “Analysis of plasmids in fosfomicin- and colistin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from meat products.” 11th Food Science, Biotechnology and Safety Congress Latin Food 2022. 13 al 15 de noviembre de 2024.
3. Manel Camps, **María G. Balbuena-Alonso**, Gerardo Cortés-Cortés, Jay Kim, Patricia Lozano-Zarain, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. Genomics studies support the role of food strains of *E. coli* as plasmid reservoirs for genetic exchange of virulence and antibiotic resistance genes with clinical strains. International symposium on plasmid biology 2024. 2 al 6 de Septiembre de 2024. Hamamatsu, Shizuoka, Japón.
4. Lorena Babines Orozco, Gerardo Cortés Cortés, **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Ygnacio Martínez Laguna. “Productos cárnicos: un reservorio potencial de cepas de *E. coli* resistentes a fosfomicina y colistina.”. XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 22 al 25 de mayo de 2024. Puebla, México.
5. Luis Mario Ibarra Moreno, Alejandra Maldonado Gálvez, **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Carlos Aarón de la Torre Perdomo, Patricia Lozano-Zaraín, Rosa del Carmen Rocha-Gracia. “Estudio de clonalidad de cepas de *E. coli* multidrogoresistentes productoras de BLEE aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. XLVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 22 al 25 de mayo de 2024. Puebla, México.
6. Alejandra Maldonado Gálvez, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Luis Mario Ibarra Moreno, Carolina Acevedo O., Hania A. Alcalá M, Ismael CruzVázquez, Patricia Lozano Zarain, Rosa Del Carmen Rocha Gracia. “Análisis plasmídico de *E. coli* MDR aislados de biopsias intestinales de pacientes con EII”. XLVII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 24 al 27 de mayo de 2023. Veracruz, México.
7. Luis Mario Ibarra Moreno, Alejandra Maldonado Gálvez, **Maria Guadalupe Balbuena Alonso**, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Estudio de clonalidad de cepas de *E. coli* multidrogoresistentes, aisladas de biopsias de un paciente con

Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. Modalidad Póster. Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos. 22 y 23 de noviembre 2023. Puebla, México.

8. Lorena Babines Orozco, Gerardo Cortés Cortés, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Ygnacio Martínez Laguna. “Análisis de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos cárnicos”. Modalidad Póster. Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos. 22 y 23 de noviembre 2023. Puebla, México.

9. Ismael Cruz Vázquez, Alicia Helena Márquez Bandala, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Resistencia plasmídica a quinolonas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. Modalidad Póster. Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos. 22 y 23 de noviembre 2023. Puebla, México.

10. Cristian Flores Morales, Gerardo Cortés Cortés, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Patotipos de *Escherichia coli* aisladas de mascotas y su virulencia en un modelo de *Galleria mellonella*”. Modalidad Póster. Primer Simposio de Farmacología: Combatiendo la Resistencia a los Antimicrobianos. 22 y 23 de noviembre 2023. Puebla, México.

11. Alejandra Maldonado Gálvez, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Carolina Acevedo Ocampo, Hania A. Alcalá Martínez, Carlos Aarón de la Torre Perdomo, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Determinación de resistencia antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* asociada con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. Modalidad Póster. 4to Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas y XXV Semana del Química, 2022. 28 de noviembre al 1 de diciembre 2022. H. Caborca, Sonora.

12. Alejandra Maldonado Gálvez, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Carolina Acevedo Ocampo, Hania A. Alcalá Martínez, Carlos Aarón de la Torre Perdomo, Patricia Lozano Zarain, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal”. Modalidad Póster. XL Congreso Interamericano de Infectología Pediátrica “Dr Raúl Romero Cabello”. 17 al 19 de noviembre 2022. Guadalajara, Jalisco.

13. Suemy Anahí Cen Nájera, Gerardo Cortés Cortés, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Patricia Lozano Zarain, Margarita María de la Paz Arenas Hernández. “Análisis bioinformático comparativo del viruloma, resistoma y mobiloma en genomas completos de *E. coli* uropatogénica y *E. coli* comensal”. Modalidad

Póster. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021. 25 al 28 agosto 2021. Asunción, Paraguay.

14. Monserrat Aguirre-Lara, Patricia Lozano Zarain, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Gerardo Cortés Cortés, Margarita María de la Paz Arenas Hernández, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Análisis bioinformático de la virulencia en genomas de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva (AIEC) depositados en bases de datos públicas”. Modalidad Póster. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021. 25 al 28 agosto 2021. Asunción, Paraguay.

15. Carolina Acevedo Ocampo, Hania Anai Alcalá Martínez, Carlos Aarón de la Torre Perdomo, **María Guadalupe Balbuena Alonso**, Patricia Lozano Zarain, Gerardo Cortés Cortés, Rosa del Carmen Rocha Gracia. “Análisis de la resistencia a rifaximina en *Escherichia coli* Adherente-Invasiva (AEIC) depositadas en el *GenBank*”. Modalidad Póster. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021. 25 al 28 agosto 2021. Asunción, Paraguay.

12.7 Cursos y talleres

1. **Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos bioinformáticos.** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Agosto a octubre 2023. (44 h)
2. **WCSC Genomic & Epidemiological Surveillance of bacterial Pathogens – Latin America and the Caribbean.** Wellcome Connecting Science & Ministerio de Salud de Paraguay 16 al 21 de abril 2023. (50 h)
3. **Interpretación del Antibiograma: del laboratorio a la práctica clínica.** Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica (AMIMC) y la organización general de la Red de Educación Médica Continua (redEMC) junto a la Sociedad Brasileira de Infectología (SBI), con el patrocinio Científico de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC). Abril a junio 2023.
4. **Herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas bacterianos y su aplicación en ciencias biológicas y de la salud.** Universidad de Buenos Aires. Departamento de farmacia y bioquímica, Argentina. Febrero a marzo 2023. (40 h)
5. **Introducción a la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos.** Asociación Mexicana para la Protección de los alimentos, A.C. marzo 2022. (30 h)
6. **Estadística para principiantes usando R.** Biofreelancer. Octubre 2021. (16h)
7. **Bioinformática 01: Linux para principiantes.** Enero 2021. (16 h)
8. **Data Science 01: R para principiantes.** Biofreelancer. diciembre 2020. (16 h)
9. **Herramientas bioinformáticas para el análisis de datos de secuenciación masiva.** Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Autónoma de México (UNAM). 19 de octubre al 3 de noviembre 2020. (80 h)

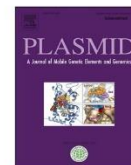
12.8 Actividades de difusión y divulgación

1. Podcast con mención honorífica "***Escherichia coli*: ¿Amiga o Enemiga?**", en el Tercer concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP. Noviembre 2024, BUAP, Puebla.
2. Ponencia titulada: "**Bacterias a la vista: epidemiología genómica y plásmidos en acción**" en la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chiapas. 13 de noviembre de 2024.
3. Ponencia titulada "**Epidemiología genómica: una historia de plásmidos y antibióticos**" en el departamento de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Iberoamericana. 25 abril 2024. Puebla.
4. Artículo de divulgación: Camps, M, Rocha-Gracia, R, Balbuena-Alonso, M, Cortés-Cortés, G, Lozano-Zarain, P, (2023) **From friend to foe: Food strains share their toxic genes in *E. coli***. Research Outreach, 136. 10.32907/RO-136-4779129951
5. Ponencia titulada "**Resistencia a antibióticos en bacterias de origen clínico y alimentario**" en el departamento de Ciencias e Ingenierías de la Universidad Iberoamericana. Julio 2023. Puebla
6. Colaborador en el recorrido "**El símbolo de la resistencia: las Superbacterias**", durante el Puertas abiertas BUAP 2022. 3 de diciembre del 2022, BUAP, Puebla.
7. Podcast con mención honorífica "**Hablemos claro: Resistencia bacteriana a los antibióticos**", en el Primer concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP. Noviembre 2022, BUAP, Puebla.
8. Conferencia titulada "**Hablemos claro: el camino a las superbacterias**" en el Colegio de Bachilleres del Estado de Puebla, Plantel 12. 7 noviembre 2022. Puebla.



Contents lists available at ScienceDirect

Plasmid

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yplas

Original Research Article

Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes

María G. Balbuena-Alonso^a, Gerardo Cortés-Cortés^{a,b}, Jay W. Kim^b, Patricia Lozano-Zarain^a, Manel Camps^{b,*}, Rosa del Carmen Rocha-Gracia^{a,*}

^a Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla 72570, Mexico

^b Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA



ARTICLE INFO

Keywords:

Escherichia coli
Food plasmids
Antimicrobial resistance
Plasmid origin of replication
Plasmid taxonomic units
Comparative genomics

ABSTRACT

The link between *E. coli* strains contaminating foods and human disease is unclear, with some reports supporting a direct transmission of pathogenic strains via food and others highlighting their role as reservoirs for resistance and virulence genes. Here we take a genomics approach, analyzing a large set of fully-assembled genomic sequences from *E. coli* available in *GenBank*. Most of the strains isolated in food are more closely related to each other than to clinical strains, arguing against a frequent direct transmission of pathogenic strains from food to the clinic. We also provide strong evidence of genetic exchanges between food and clinical strains that are facilitated by plasmids. This is based on an overlapped representation of virulence and resistance genes in plasmids isolated from these two sources. We identify clusters of phylogenetically-related plasmids that are largely responsible for the observed overlap and see evidence of specialization, with some food plasmid clusters preferentially transferring virulence factors over resistance genes. Consistent with these observations, food plasmids have a high mobilization potential based on their plasmid taxonomic unit classification and on an analysis of mobilization gene content. We report antibiotic resistance genes of high clinical relevance and their specific incompatibility group associations. Finally, we also report a striking enrichment for adhesins in food plasmids and their association with specific IncF replicon subtypes. The identification of food plasmids with specific markers (Inc and PTU combinations) as mediators of horizontal transfer between food and clinical strains opens new research avenues and should assist with the design of surveillance strategies.

1. Introduction

Escherichia coli (*E. coli*) is a bacterial species found in the environment that colonizes the gastrointestinal tract of humans and animals. Most strains of *E. coli* are harmless commensals, but there are pathogenic lineages capable of producing severe intestinal and extraintestinal disease (sepsis, urinary tract infections, meningitis) (de Santos et al., 2020).

E. coli is characterized by frequent genetic exchanges across different strains and even with other species, a process known as horizontal gene transfer (HGT). The resulting high genomic plasticity has allowed *E. coli*

to adapt to different selective pressures exerted in various environments, including the rapid evolution of resistance to antibiotics frequently used in the clinic, notably β -lactam antibiotics, fluoroquinolones, and aminoglycosides (Baquero et al., 2013; Palmer and Kishony, 2013; Hughes and Andersson, 2017; Baquero et al., 2021).

E. coli strains can be classified into large groups by phylotype (according to phylogenetic relationship) and by pathotype (according to pathogenic profile). Serotyping and Multi-Locus Sequence Typing (MLST) are two methods used to provide a higher level of resolution. Serotyping is based on an agglutination test performed with a panel of

Abbreviations: MLST, Multilocus Sequence Typing; STs, sequence types; MGEs, Mobile Genetic Elements; TA, Toxin-antitoxin module; MDR, multidrug resistance; ssDNA, single-stranded DNA; MOB, mobilization module; PTU, Plasmid Taxonomic Unit; PSK, Post-Segregational Killing; HUS, Hemorrhagic Uremic Syndrome; Inc, Incompatibility Group; Par, partition gene; OriT, transfer origin of replication; JI, Jaccard index.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mcamps@ucsc.edu (M. Camps), rochagra@yahoo.com, rosa.rocha@correo.buap.mx (R. del Carmen Rocha-Gracia).

<https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102650>

Received 2 May 2022; Received in revised form 8 September 2022; Accepted 15 September 2022

Available online 18 September 2022

0147-619X/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

reference antisera with the ability to discriminate variations in the genes responsible for the biosynthesis of structures such as the flagellum, the lipopolysaccharide (LPS), and the capsule (Fratamico et al., 2016). The MLST classification is based on the presence of unique combinations of alleles for seven housekeeping genes (Clermont et al., 2015). A few sequence types (STs) have emerged as epidemic, being present at high frequencies all over the world. Prominent among these is ST131, a clone whose expansion has been accompanied by the acquisition of fluoroquinolone resistance, of an adhesion virulence factor, and of a set of plasmid-borne antibiotic resistance genes (ARGs) (Nicolas-Chanoine et al., 2014; Mathers et al., 2015).

HGT is greatly facilitated by plasmids, which are autonomously replicating pieces of DNA. In addition to the genes needed for plasmid homeostasis, plasmids frequently contain a cargo of genes involved in adaptation to environmental challenges (Carroll and Wong, 2018; Virolle et al., 2020; Lehtinen et al., 2021).

Establishing phylogenetic relationships between plasmids is a major challenge for the field given the instability of their sequence, which is constantly shuffled by recombination. Cargo content and individual genes involved in replication (*ori*) (Carloni et al., 2017) or conjugation (relaxase) (Garciillán-Barcia et al., 2009) have been used to define genetic relatedness between plasmids, with only partial success. Recently, a method based on the fraction of sequence that perfectly aligns between two plasmids (the alignment fraction) has been used to define Plasmid Taxonomic Units (PTUs), which cluster plasmids by phylogenetic relatedness more reliably than other methods (Redondo-Salvo et al., 2021). This analysis in turn has allowed the systematic tracking of plasmid exchanges across different taxonomic boundaries (Redondo-Salvo et al., 2020).

Plasmid-mediated horizontal gene transfer is depending on conjugation (transfer of ssDNA by a process involving nicking of the donor DNA and cell-cell contact), transformation (uptake of DNA from the environment), or transduction (genetic exchange mediated by a phage). The conjugation ability of a given plasmid can be inferred based on the presence of a complete complement of the machinery that is required for self-transmission, which consists of four MOB (mobilization) modules: an origin of transfer site (*oriT*); a relaxase gene that cleaves the *oriT*, generating a ssDNA; and two mating channel components: a gene encoding type IV coupling protein (T4CP) and a gene cluster for bacterial type IV secretion system (T4SS) (Virolle et al., 2020; Cabezón et al., 2015). A full set of MOB genes but can still be transferred if the missing factors are produced in *trans* by helper plasmids. These are called mobilizable plasmids (Werisch et al., 2017). Within plasmids, mobilization is further facilitated by sequence elements that facilitate recombination such as transposons, which are generally known as mobile genetic elements (MGEs) (Partridge et al., 2018).

In this article, we focus on two types of cargo, namely antibiotic resistance genes (ARGs) and virulence genes. ARGs involve a variety of mechanisms, but the most frequent mechanism found in plasmid-borne ARGs is antibiotic inactivation. Inactivation can be dependent on degradation (e.g., β -lactamases enzymes), on chemical modification (e.g., aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzymes) or on the modification of the target (e.g., *qnr* for fluoroquinolone resistance, *mcr-1* for colistin resistance, and *RmtA* and *armA* 16S rRNA methylases for aminoglycoside resistance) (Hughes and Andersson, 2017; Baquero et al., 2021; Poirel et al., 2018). Virulence genes encode for (among others) adhesins, invasins, toxins, hemolysins, iron homeostasis genes, antioxidants, and other immune evasion genes, as well as secretion systems (Bakour et al., 2016; Munson, 2013). Given that the exchange of ARGs and virulence genes is mediated by similar MGEs, these two categories of genes are frequently linked, which is one of the reasons why multidrug resistant strains (MDR) also tend to be more virulent and why MDR is becoming such a serious public health problem (Ramirez et al., 2014; Guillard et al., 2016).

The transmission of virulent *E. coli* strains to humans involves different routes of infection. In this work, we investigate the risk posed

by contaminated food. The role of food as a reservoir for pathogenic *E. coli* infection is still under discussion. Some studies argue against this idea based on differences in the clonal lineage profile of food-borne and clinical strains (Ludden et al., 2019; Nguyen et al., 2021); however, other studies comparing *E. coli* isolates from humans with isolates from food-producing animals identified genetically related plasmids that are shared between the two pools, suggesting that plasmid-mediated HGT from food strains may contribute to the pathogenicity and drug resistance exhibited by clinical strains (Day et al., 2016; Reid et al., 2019; Madec and Haenni, 2018a). Here, we compared a dataset of fully assembled genomes from food *E. coli* isolates with the genomes of clinical isolates available from GenBank. We found that strains isolated in food are consistently more closely related to each other than to clinical strains, arguing against a frequent transmission of food strains to the clinic. We also show that food plasmids have a high mobilization potential and provide strong evidence of genetic exchange between food and clinical plasmid pools. This exchange appears to depend on a small subset of genetically-related plasmids. We identify the PTU and Inc group markers associated with these plasmids and reveal a degree of specialization, with some PTU-Inc group clusters preferentially transferring virulence factors over ARGs. We also identify resistance genes of high clinical relevance and their incompatibility group associations. The identification of plasmids preferentially mediating HGT between food and clinic compartments opens new avenues of research and should assist with the design of surveillance strategies.

2. Methods

2.1. Selection of sequences of *E. coli* genomes

Completely assembled *E. coli* genomes deposited until December 31, 2020 in the GenBank database were selected and checked for the presence of chimeric, contaminated, duplicated, or misassembled sequences. The final database contains genomes that passed these quality controls. Ninety-three sequences were excluded because they were defined as anomalous, corresponded to partial chromosomal or plasmid DNA sequences, not available or duplicated due to updating their assembly number or were internal control sequences of sequencing platforms. Manual curation using NCBI Pathogens detection, and the Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) databases, information deposited in each Bioproject, Biosample or the reported associated was performed to confirm the type of sample and the source of isolation to select those of food and human clinical origin; each of the strains associated with the genomes was considered uniquely from the source reported by the authors; thus, no section showed a strain collected from both origins at the same time. The files downloaded from each genome were *fna* (fasta nucleic acids), *faa* (fasta protein sequence), and *gbk*; these files were used depending on the input needed by each bioinformatics tool. Also, all plasmids were collected from the NCBI nucleotide database, from the resources INSDC (which includes DDBJ, EMBL-EBI and GenBank) and RefSeq; preferring RefSeq records over the INSDC records. The record was required to have the assembly tag "Complete genome". When the plasmid record was linked to multiple assembly IDs only the assembly with the label "latest" was assigned to this record.

2.2. Genomic analysis

Genomes were assigned to an *E. coli* phylogroup using Clermont-Typing 1.4 (Beghain et al., 2018) (<http://clermonttyping.iame-research.center>). In addition, *E. coli* MLST profiles were predicted using the Achtman seven gene MLST scheme at PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp> (accessed on February 26, 2021)), the serotypes (O:H) were predicted with Serotype finder 2.0 (Joensen et al., 2015) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>), and pathotypes were assigned according to the presence of specific marker virulence genes (Robins-Browne et al., 2016) using the BLASTn tool (85% identity and

60% minimum length, and *E*-value ≤ 0.000001) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST); those containing markers of different pathotypes were described as hybrids and named according to the literature. The source of isolation for the designation of UPEC pathotype was also included. Where available, the pathotype description was described as the original publication. To analyze phylogenetic relationship, the chromosomes of food and clinical *E. coli* were used using the default parameters of CSI Phylogeny 1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny>) default parameters and *E. coli* K-12 was used as reference (NC_000913.3) (Kaas et al., 2014). Subsequently, the dendrogram was constructed using the maximum likelihood method with 1000 bootstrap replicates using FastTree 2.1 (Price et al., 2009). Finally, it was visualized using iTOL 6.0 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic and Bork, 2016).

2.3. Plasmid analysis

To identify plasmid genomes in genomic assemblies of *E. coli*, a manual review of the plasmids registry in each genome in GenBank was performed and the PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (85% identity and 60% minimum length) was used to identify the replicon present for each plasmid (Carattoli et al., 2014), and pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>) was used to determine the subtypes in those defined as IncF plasmids (Villa et al., 2010). Plasmid Taxonomic Units (PTU) were identified by COPLA (a taxonomic classifier of plasmids) using the recommended parameters (Redondo-Salvo et al., 2020) (<https://castillo.dicom.unican.es/copla/>).

The presence of conjugation elements in plasmids was identified by using the tool OriTfinder 1.1 (Li et al., 2018) (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/>) with modified parameters (Blast *E*-value 0.00001) and the identity of relaxases was confirmed with MOBScan (Garcillán-Barcía et al., 2020) (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan>) with default settings. The classification of plasmids was established according to their MOB and MPF content: Conjugative (presence of *oriT*, relaxase, TC4P and TSS4); non-mobilizable (absence of *oriT* or relaxase) and mobilizable (presence of *oriT* and relaxase, with variable TC4P) (Smillie et al., 2010).

To analyze the phylogenetic relationship of representative plasmids, the complete nucleotide sequences of the outstanding over-representation and overlapping plasmids in both data subsets were compared using the neighbor-joining method. This method was used to construct a phylogenetic tree with 1000 bootstrap replicates (Hong et al., 2021). Finally, it was visualized with iTOL 6.0 (<https://itol.embl.de/>) (Letunic and Bork, 2016).

2.4. Identification of antimicrobial resistance and virulence genes in plasmids

ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) and VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) were used to identify the acquired antimicrobial resistance genes as well as the virulence gene content, respectively; with search parameters at a 90% threshold for identity and 60% minimum length (Bortolonia et al., 2020; Tetzschner et al., 2020). Genes were considered to overlap when the same label was identified in food and in clinical plasmids. To visualize the genetic structure of the plasmids carrying two genes of special clinical interest (NDM-5 and *mcr-1.1*); sequences were initially annotated with Prokka 1.14.6 (Seemann, 2014) and, mobile genetic elements related to antibiotic resistance were identified using Mobile Element Finder 1.0.3 from the Center of Genomic Epidemiology (Johansson et al., 2021) using the default parameters. Relevant plasmids were aligned with BRIG 0.95 (Alikhan et al., 2011) and visualized using Proksee.ca 1.0.

2.5. Statistical analysis

The analysis was mainly descriptive, showing proportions as

percentages and continuous variables as mean and SD. The Mann-Whitney test was used to compare distributions. We estimated the probability of overlap of virulence genes and antibiotic resistance genes using Monte Carlo simulation with 10^4 iterations; the genes identified in both sets (175 resistance genes and 72 virulence genes) were used as input data; 161 data were randomly sampled for each group, and 10^4 iterations were performed, indicating the number of plasmids each time, calculating the overlap in each iteration. Rstudio statistical software 1.4.1103 was used to perform all analyses.

2.6. Jaccard index calculations

The Jaccard index (JI) measures the co-occurrence of two binary features, and ranges from 0 (mutual exclusion) to 1 (total co-occurrence). To calculate this index, we used the following formula:

$$J(m_i, m_j) = \frac{1}{|M|} \sum_{m \in M} \frac{\#strains\ in\ ST_m\ with\ m_a\ and\ m_b}{\#strains\ in\ ST_m\ with\ m_a\ or\ m_b}$$

where M is the set of plasmids belonging to a given Inc or PTU, m_a is the number having resistance (JI for resistance) or virulence (JI for virulence) in food plasmids and m_b , the number having resistance (JI for resistance) or virulence (JI for virulence) in clinical plasmids.

3. Results

3.1. *E. coli* genomic database

We generated a database of 1794 complete *E. coli* genomes available at the end of 2020 from GenBank at the National Center of Biotechnology Information (NCBI). The quality controls are described in **Methods**. We focused on genomes from food ($n = 77$) and from clinical sources ($n = 649$); their corresponding accession numbers are available in **Table S1A** and epidemiological classification could be found in **Table S1B** of the supplementary materials.

These genomes came from six different sources (**Fig. S1A**). Human clinical samples were the most abundant (36%). A total of 45% of these samples were recovered from feces, urine, and blood; the rest came from samples of other body fluids, secretions, expectorations, swabs and generically described by the authors as human clinical specimens. Strains obtained from food sources, by contrast, represented only 4% of the isolates. The majority of these food-associated samples such as meat (cattle, poultry, and swine) or dairy products (cheese and milk) were linked to food-producing animals. Other food-associated samples came from fresh produce and flours (**Fig. S1B**). Note that the geographic distribution of the sampling was skewed for genomes from countries that have clinical environment- and foodborne outbreak-surveillance systems in place. Therefore, isolates from Africa, Oceania, Latin America, and Asian countries other than China were infrequent (see **Table S1B**).

3.2. Lineage classification

Population studies of *E. coli* have mainly described eight phylogroups (A, B1, B2, C, D, E, F, and G) (Clermont et al., 2013; Clermont et al., 2019). Seven of these eight phylogroups (A, B1, B2, C, D, E, F) were represented in both populations, demonstrating that *E. coli* exhibits an extremely wide genetic diversity in both populations. The relative abundance of these phylogroups was also similar in both populations (**Fig. 1**), though phylogroup B2 was much more abundant in clinical isolates (21%, compared to 1%). This striking difference is consistent with several reports (Clermont et al., 2000; Nojoomi and Ghasemian, 2019; Oteo et al., 2010) and is likely due to the presence of UPEC isolates, which represent a significant percentage of the identified phylogroup B2.

When we go down to the level of STs, by contrast, we see a highly discordant ST profile: of the 218 STs present in the combined dataset,

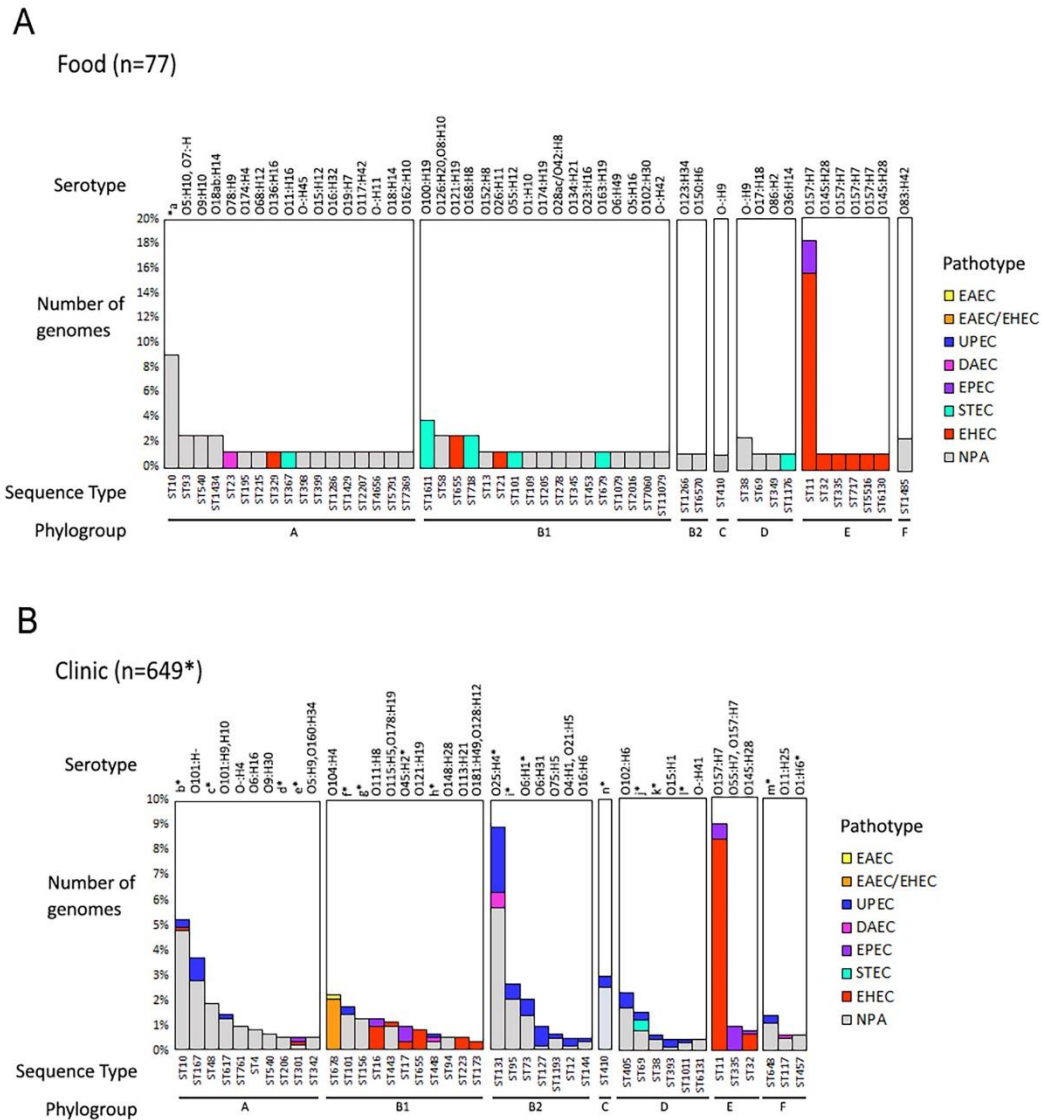


Fig. 1. Phylogroup, serotype and pathotype classification. A Food strains. B Clinical strains. Different pathotypes are highlighted using the following color code; yellow (EAEC), orange (EAED/EHEC), blue (UPEC), pink (DAEC), purple (EPEC), cyan (STEC), red (EHEC) and gray (NPA, non-pathotype associated). In B only STs with more than three genomes are shown. The asterisks indicate the STs in which more than three different serotypes are found. The complete information can be found in Table S1A and Table S1B of supplementary materials.

only 16 STs overlapped. This observation is in agreement with previous reports noting substantial lineage differences between food and clinical isolates (Ludden et al., 2019; Nguyen et al., 2021). Of the overlapping STs, ST11 is the most prevalent (23% in food and 11% in clinical), suggesting that ST11 strains may exhibit a high level of fitness in both ecological niches, and is thus potentially highly transmissible. The high transmissibility of ST11 via food would be congruent with studies that report the classification ST11 with clone EHEC O157:H7, which is a strain linked to outbreaks of human infections caused by the consumption of contaminated meat (Page and Liles, 2013; Bolukaoto et al., 2019). Clone EHEC O157:H7 has been reported as a pathotype adapted to cattle and disseminated to humans through direct contact with animals or through the environment or food (Koraimann, 2018; Yang et al.,

2017; Lorenz et al., 2016).

Fig. 2 shows the phylogenetic relatedness between food and clinical strains in the form of a cladogram, as well as the phylogroup and sequence type classification. An almost complete segregation between clinical and food strains is apparent, with all food strains clustered in two sectors (see Methods). Taken together, the discordance in STs and the segregation seen in the cladogram between food and clinical strains, strongly argue against a frequent transmission of food strains to the clinic, with the possible exception of some ST11 strains.

We identified four pathotypes in food genomes (EHEC, EPEC, STEC, DAEC) and three additional ones in clinical genomes (UPEC, EIEC, and EAEC). EHEC was the most frequent pathotype in both populations (Fig. 1). The lack of EAEC strains or EAEC/EHEC hybrid pathotypes in

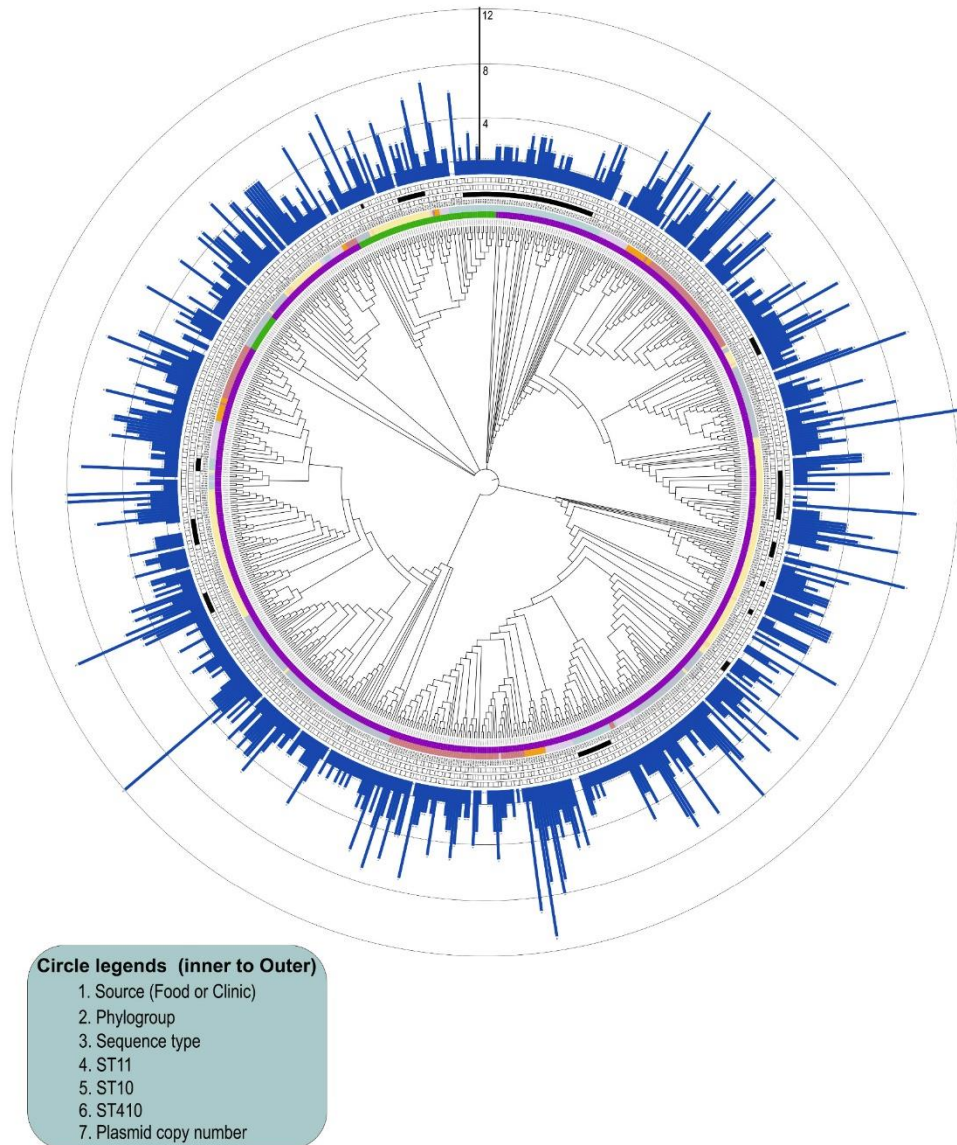


Fig. 2. Phylogenetic analysis. The phylogenetic relationships between the strains included in this study (726 sequenced strains, 77 from food and 649 from clinical sources genomes) are shown as a cladogram. This graphic representation was generated using the CSI Phylogeny platform, with *Escherichia coli* K-12 (NC.000913.3) as a reference genome. From inner to outer, the circles represent the following: Circle 1: Source. Food (green) or Clinic (purple). Circle 2: Phylogroup. A (light yellow), B1(light blue), B2 (pink), C (light orange), D (violet), E (sky blue) and F (orange). Circle 3: Sequence type assigned using MLST platform (see Methods). Circle 4–6 (Top 3 ST in clinic and food): ST11 (Circle 4), ST10 (Circle 5), ST410 (Circle 6). Circle 7: Plasmid copy number, i.e. the number of plasmids per host strain (dark blue) with lines as references for: 1, 4, 8 and 12 plasmids.

food strains is surprising, based on reports of strains found in food matrices that are genetically similar to strains isolated from urinary tract infections (Singer, 2015; Yamaji et al., 2018) and the report of EAEC/EHEC hybrid pathotypes in a large foodborne outbreak in Europe (Muniesa et al., 2012). This observation is likely due to a combination of the small sample size of our food strains and to the biases inherent to epidemiological surveillance programs.

3.3. Profiling of plasmids based on general structural and functional features

A total of 161 plasmids were identified in genomes from food strains based on circular assemblies of <500 kb in size linked to at least one plasmid replicon. Using the same approach, we found 1624 plasmids in the genomes of clinical strains (see Methods).

Both plasmid populations present a comparable, very broad range of sizes (1.1 kb - 404 kb) and a trimodal distribution (Fig. S2). Food and clinical strains have a moderately different average number of plasmids

per host (2.0 and 2.5 plasmids per genome, respectively, Figs. 2, S2).

Plasmids are classified into incompatibility (Inc) groups based on the inability of two plasmids of the same group to be stably maintained in the same cell. This functional classification was initially proposed as a rough phylogenetic classification by identifying redundancy in plasmid copy number regulatory elements within a replicon (Bouet and Funnell, 2019; Novick, 1987) although it is known to be an imperfect marker of phylogenetic relatedness (Redondo-Salvo et al., 2020). When no known replicon was assigned by PlasmidFinder, we defined plasmid as Non-Typeable (NT).

PlasmidFinder identified 27 Inc categories in *E. coli*-plasmids isolated from food, compared to 40 for clinical strains. The frequency distribution of the 23 Rep categories that overlap between the two groups is similar, shown in Fig. S3. IncF plasmids were further typed using the subtype classification described by Villa et al. (Villa et al., 2010). Table 1A shows the relative representation of replicon categories as a ratio of frequency in the clinical plasmid pool versus frequency in the food plasmid pool. The following five Inc groups stand out for their overrepresentation in food plasmids: IncR (10× overrepresentation), IncH1B (6×), and Inc X1 (3×) and two IncF subtypes: IncF(F⁻:A⁻:B1) (2.9×) and IncF23:A⁻:B3 (2.75×).

3.4. Plasmid profiling according to mobilization and promiscuity features

Food and clinical plasmids were sorted into three categories corresponding to their predicted transfer capacity: conjugative, mobilizable (i.e., can be conjugated in the presence of a helper plasmid), and non-mobilizable (See Methods). For the food plasmid population, 27.3% of the plasmids were classified as conjugative, and 9.3% as mobilizable, compared to 30.3% and 6.3%, respectively, for clinical plasmids. Almost all conjugative plasmids were larger than 25 kb, while mobilizable plasmids were mostly small, suggesting that in most cases small plasmids are mobilized with the help of large conjugative plasmids (Fig. 3). This size distribution is consistent with previous reports (Rozwandowicz et al., 2018). Overall, we found that over one third of all food plasmids had the elements necessary for HGT, and that this fraction was similar in food and clinical plasmids.

We next grouped the plasmids by phylogenetic relatedness through COPLA, a recently developed method that classifies plasmids into

Plasmid Taxonomic Units (PTUs) based on nucleotide identity alignment fractions (see Methods and 16). COPLA was only able to assign a PTU to 124 of the 161 food plasmids (distributed in 39 different PTUs); in the case of clinical plasmids, 1236 out of a total of 1624 plasmids were assigned to 60 different PTUs. Three of the 39 food PTUs (PTU-E46, PTU-E54, and PTU-E79) were absent in the clinic (Table S2). Fig. 4A shows the PTU classification of all classifiable food plasmids.

Compared to Inc group representation, PTU representation across the two compartments showed a wider range of representation bias, with a 57% increase in the standard deviation of the representation ratios (Tables 1A–B). Three PTUs stood out for their overrepresentation in food plasmids: PTU-H11A, -E50, and -E52 (5–8.7-fold enrichment) and two PTUs were overrepresented in clinical strains: PTU-E9 and -I1 (2–2.9-fold) (Table 1B).

Based on their predicted promiscuity, PTUs fall into six categories or “grades”, denoted by Roman numerals. Grade I represents promiscuity restricted to the level of species, II to the level of genus, III to family, IV to order, and V to class. Fig. 4A shows the host range for the PTUs found in food plasmids. Note that out of the 79 plasmids, 25.3% have predicted promiscuity up to the level of family, 7.6% to the level of order, and 2.5% going all the way to the level class.

A seminal study published in 2020 (Redondo-Salvo et al., 2020), mapped the presence of PTUs across Enterobacteriaceae. Fig. 4B shows other bacterial genera identified as primary hosts for the PTUs found in *E. coli* food plasmids. These include eight genera of Enterobacteriaceae, with *Salmonella* and *Klebsiella* being the best represented ones (13 and 10 PTUs, respectively). Overall, the PTU analysis confirms the very high potential for horizontal transfer of these food-borne plasmids.

3.5. Plasmid ARG cargo

Known ARGs were identified in our plasmids using ResFinder (Bortolonia et al., 2020). We found 175 ARGs belonging to at least 14 different antibiotic resistance families. The results are summarized in Table 2 and listed in Table S3. All families were similarly represented in both plasmid populations, with β -lactamases, aminoglycosides, fluoroquinolones, and trimethoprim ranking top, in this order. Only two families were found exclusively in clinical plasmids, namely fosfomycin resistance genes, and efflux pump encoding variants (Table 2).

Table 1A

Relative representation of replicon categories as a ratio in the clinical plasmid vs food plasmid and JI indexes for plasmids with $n \geq 3$ for both food and clinical plasmids.

Inc Group	Total number of plasmids	Number of food plasmids	Number of clinical plasmids	Ratio of clinic vs food representation	JI resistance	JI virulence	JI total
Col	102	9	93	1.02	0.00	0.00	0.00
Col156	53	4	49	1.21	0.00	0.20	0.20
ColRNAI	118	9	109	1.20	0.00	0.00	0.00
IncB/O/K/Z	70	6	64	1.06	0.09	0.33	0.21
IncC	27	3	24	0.79	0.10	0.11	0.10
IncF (F ⁻ :A ⁻ :B ⁻)	146	16	130	0.81	0.02	0.11	0.06
IncF (F ⁻ :A ⁻ :B1)	31	7	24	0.34	0.18	0.40	0.25
IncF (F2:A ⁻ :B ⁻)	58	3	55	1.82	0.02	0.06	0.02
IncF (F23:A ⁻ :B3)	70	15	55	0.36	0.00	0.45	0.29
IncH1B	8	3	5	0.17	0.03	0.25	0.05
IncI1	90	4	86	2.13	0.14	0.11	0.13
IncR	12	6	6	0.10	0.18	0.08	0.15
IncX1	22	5	17	0.34	0.17	0.00	0.15
IncY	36	5	31	0.61	0.03	0.00	0.03
NT	221	20	201	1.00	0.03	0.00	0.02
p0111	41	5	36	0.71	0.18	0.00	0.18
Average	69.1	7.5	61.6	0.85	0.07	0.13	0.12

Inc group: lists replicons with at least three plasmids represented in both the food and clinical plasmid datasets **Total number of plasmids:** indicates the total of plasmids corresponding to the Inc group listed on the left, adding both plasmid datasets. **Number of food plasmids:** lists the plasmid content in each Inc group for the food dataset. **Number of clinical plasmids:** lists the plasmid content in each Inc group for the clinic dataset **Ratio of clinic vs. food representation:** indicates the representation of clinical plasmids in relative to food plasmids corresponding to each replicon (% clinical plasmids for a given Inc group divided by the % food plasmids for a given Inc group). **JI resistance** indicates the Jaccard Index value for the resistance gene cargo, **JI virulence** indicates the Jaccard Index value for the virulence gene cargo, and **JI total** indicates the Jaccard Index value for the sum of virulence and resistance genes of the corresponding replicon (See Methods).

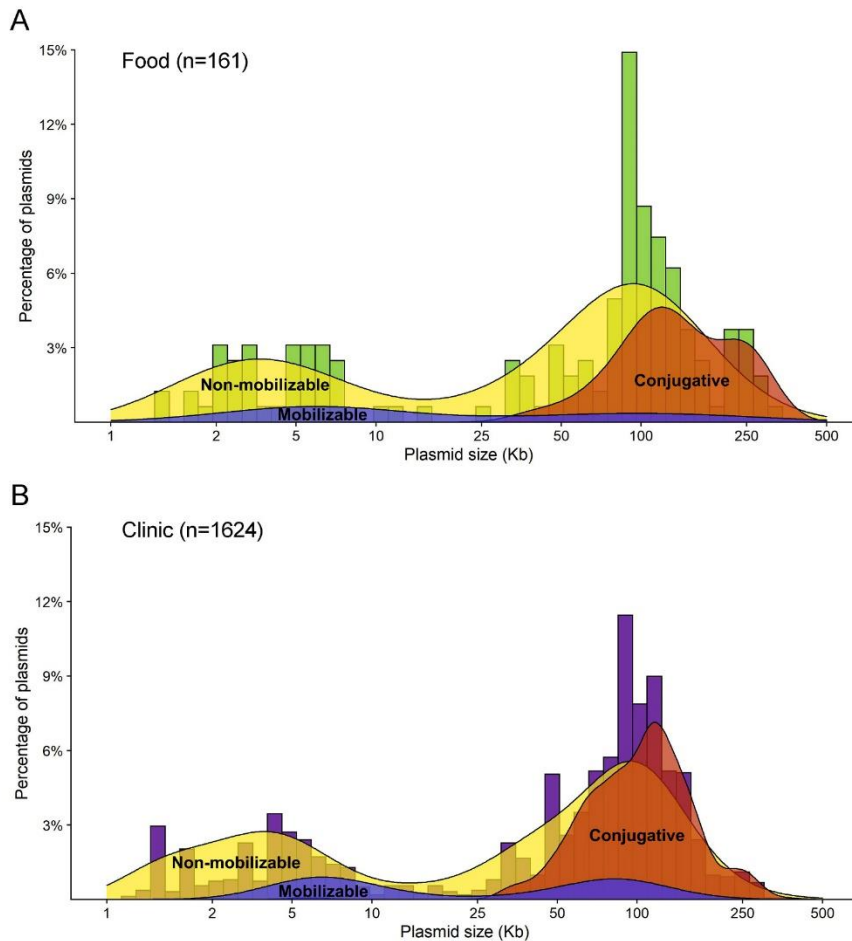


Fig. 3. Plasmid size distribution and mobilization profile. The plasmid size is shown in bins of 1 kb. The fraction of conjugative (brown), mobilizable (blue) and non-mobilizable (yellow) plasmids is also shown as area under the curve along the X axis, i.e. across increasing plasmid size. A. Food plasmids. Plasmid size shows a trimodal distribution with the following median peak sizes: 3.2, 7.3 and 93.2 kb. B. Clinical plasmids. Plasmid size shows a trimodal distribution with the following median peak sizes: 1.5, 6.6 and 109.5 kb.

The average number of ARGs per plasmid was higher in clinical than in food plasmids, but the difference corresponded almost completely to a smaller fraction of ARG-free plasmids (46.2%, compared to 65.9% for food plasmids) (Fig. S4). Of the 175 ARGs identified, only 51 genes overlapped between the two plasmid populations. Eleven ARG genes were unique to food plasmids (listed in Table 2) and 113 were exclusive to clinical plasmids. The observed gene overlap highly deviates from what would be expected from a random distribution between the two groups of plasmids, even taking into account the difference in sample size between the two groups (Table S4) ($p < 0.5$). Relative to other antibiotic resistance families, β -lactamases and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes exhibit an even lower degree of overlap (15–18%, compared to an average overlap of 27.2% for the four other families exhibiting an $n > 10$).

3.6. Linkage between ARG cargo, Inc groups, and PTUs

Next, we examined the linkage between ARGs and specific Inc groups comparing food and clinical plasmids (Supplementary figs. S5 and S6). Only three Inc groups have a resistance cargo that is over-represented in food plasmids: IncR, IncH1B, and IncF(F1:A⁻:B⁻). IncR and IncH1B are also overrepresented in food plasmids, which explains this higher contribution, but not IncF(F1:A⁻:B⁻). The latter observation implies that this IncF plasmid subtype exhibits a differentially high

cargo of ARGs relative to clinical plasmids.

We also looked at the overlap between individual ARGs found in food and clinical plasmids for each Inc group by calculating the Jaccard index (JI) for resistance (Table 1A, see Methods). The results for Inc types that have at least three plasmids in food and three plasmids in the clinic are shown in Table 1A. The JI values for resistance range between 0 and 0.18, with an average of 0.07. The highest values corresponded to IncR, IncF (F⁻:A⁻:B1), and p0111 (all JI = 0.18), IncX1 (JI = 0.17), and IncII-1 (JI = 0.14). This seems to suggest that the exchange of resistance genes between the food and clinical compartments may be channeled through a specific Inc groups.

The Inc group classification clusters plasmids by distinct modes of replication that do not necessarily reflect phylogenetic relatedness. To establish the association between ARG cargo and phylogenetically-related clusters of plasmids, we also calculated the JI for individual PTU types Table 1B. In this case, while the average JI stayed the same, the highest values went up considerably (up to 0.38). The three PTUs with the highest values were PTU-E50 (JI = 0.38), PTU-HI2 (0.24), and PTU-FE (JI = 0.23); note that this increase in maximal values does not correspond to a reduction in sample size. The increase in maximal JI values for resistance in PTUs confirms the idea that the ARG exchange between food and clinical strains is dominated by a specific cluster of phylogenetically-related plasmids.

Some PTUs involve multiple Inc groups. To obtain additional

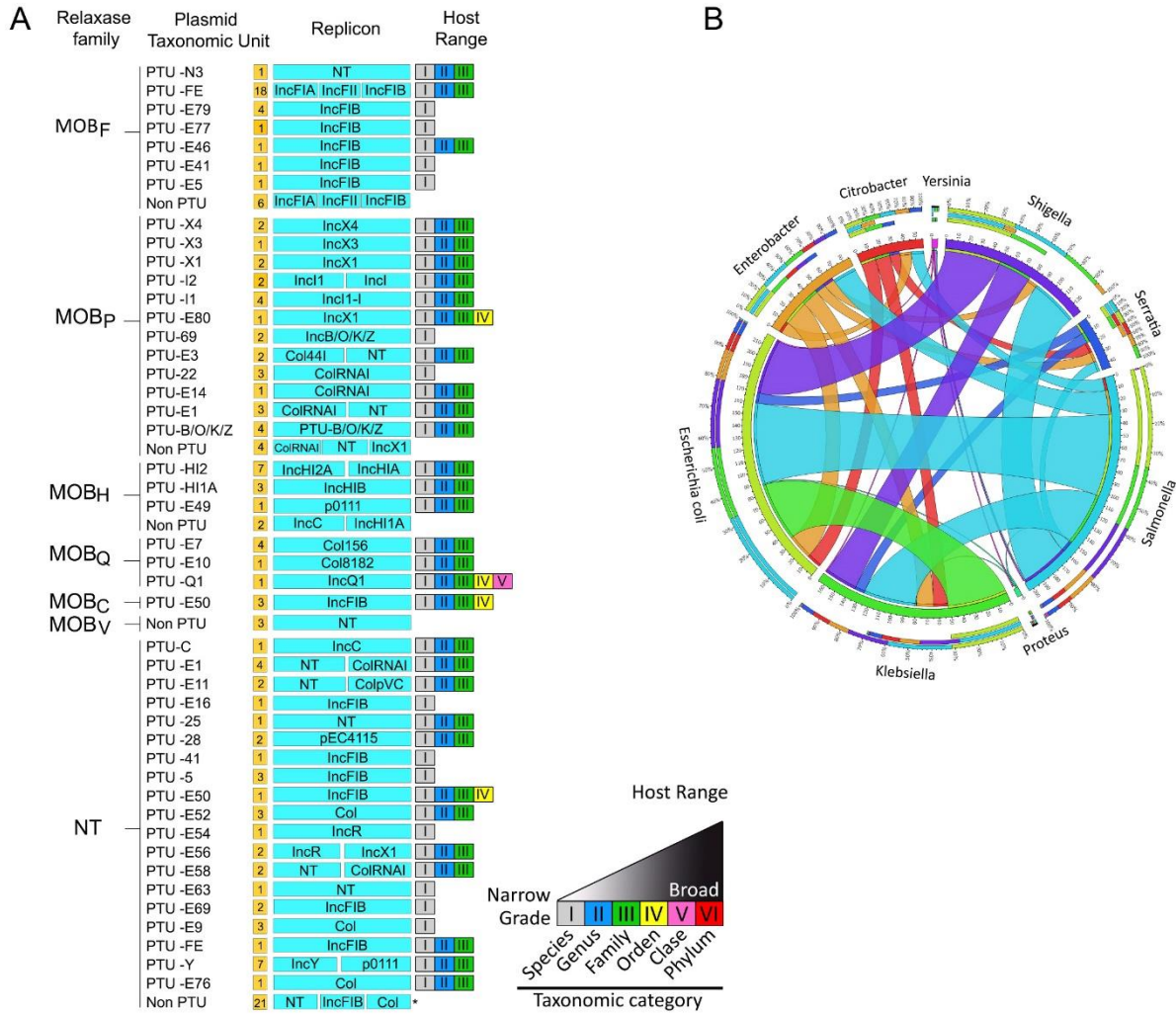


Fig. 4. A. PTU classification of food plasmids. The PTU classification of our 161 plasmids as determined by COPLA (Redondo-Salvo et al., 2020) is shown. The program was able to ascribe a PTU to 92 of them, for a total of 39 different PTUs. A. PTU classification. The 39 different PTUs found are listed, and their correspondence to relaxase families (MOB) is shown to the left of the column listing PTU classification. The number of plasmids ascribed to each of the PTUs is listed to the right, inside the orange square. Their general Rep (replicon identified by PlasmidFinder) correspondence and host range are indicated next to the corresponding boxes with roman numerals. The predicted promiscuity (i.e., host range) is indicated as one of six categories or “grades”. Grade I represents a predicted promiscuity restricted to the level of species, II to the level of genus, III to family, IV to order, and V to the level of class (see inset at the bottom). B. Chord diagram showing potential plasmid exchanges between genera. This diagram shows shared PTU presence across different genera of enterobacteria. These are listed at the periphery of the outer circle using the following color code: *E. coli* (orange), *Enterobacter* (yellow), *Klebsiella* (green), *Proteus* (aquamarine), *Salmonella* (light blue), *Serratia* (dark blue), *Shigella* (purple), *Yersinia* (pink) and *Citrobacter* (red). The genera sharing a given PTU are shown joined by a curved edge, the thickness of which is proportional to the number of shared plasmids. The color is indicative of the genus where the plasmid is thought to have originated.

granularity in our analysis, we looked at all the PTU-Inc group combinations for plasmids that are represented in both compartments; the results are shown in Fig. 5. Given the large number of PTU-replicon combinations, the average sample size went down substantially. The plasmid representation in each compartment is shown in section 3) of Fig. 5A and Fig. 5B, as it needs to be taken into consideration because a very low sample size in one of the compartments reduces the significance of the JI and inflates its value. Based on these considerations, the following PTU-replicon combinations appear to have genuine overlap in ARG gene content: PTU-B/O/K/Z Inc B/O/K/Z (JI = 0.09, with 4 plasmids for food and 43 for the clinic), PTU-HIA IncHIB (JI = 0.12, with three plasmids in each compartment) and PTU-HI2 IncHIA (JI = 0.2,

with 4 and 21 plasmids in each compartment, respectively). Within IncF plasmids, the PTU-FE IncF(A-B1) combination stands out (JI = 0.21, with 7 food plasmids and 11 clinical plasmids) (Fig. S6). Supplemental fig. S7 shows the dendrograms for the plasmids included in these PTU-Inc group combination, and in all cases, we see that plasmids found in food are closely related to plasmids found in the clinic, supporting the idea of a direct exchange between the two compartments. The overlapping genes found in plasmids belonging to these PTU-Inc categories can be seen in (Table 3). The genes *aph(6)-Id*, *aac(3)-IIId*, *aadA2*, *bla_{CITX-M-55}*, *bla_{TEM-1}*, *sul1*, *sul2*, *sul3* and *tet(A)* stand out because they were found in two of these categories.

Table 1B

The relative representation of PTU categories as a ratio of in the clinical plasmid vs food plasmid.

PTU	Total number of plasmids	Frequency in food plasmids	Frequency in clinical plasmids	Ratio of clinical vs food representation	JI resistance	JI virulence	JI total
Non-PTU	88	9	79	1.00	0.07	0.00	0.05
Non-PTU	53	4	49	1.40	0.00	0.03	0.02
Non-PTU	15	3	12	0.46	0.00	0.33	0.25
PTU-?	127	3	124	4.73	0.00	0.00	0.00
PTU B/O/K/Z	47	4	43	1.23	0.09	0.36	0.22
PTU-E1	84	7	77	1.26	0.00	0.00	0.00
PTU-E22	18	3	15	0.57	0.00	0.00	0.00
PTU-E5	80	15	65	0.50	0.00	0.45	0.31
PTU-E50	10	4	6	0.17	0.38	0.00	0.38
PTU-E52	8	3	5	0.19	0.00	0.00	0.00
PTU-E69	35	4	31	0.89	0.00	0.44	0.44
PTU-E7	40	4	36	1.03	0.00	0.20	0.20
PTU-E9	57	3	54	2.06	0.00	0.00	0.00
PTU FE	277	19	258	1.55	0.23	0.41	0.28
PTU-H1A	6	3	3	0.11	0.12	0.25	0.14
PTU-HI2	31	7	24	0.39	0.24	0.50	0.25
PTU-I1	104	4	100	2.86	0.11	0.13	0.11
PTU-Y	61	7	54	0.88	0.00	0.00	0.00
Average	63.39	5.89	57.50	1.18	0.07	0.17	0.15

PTU: lists replicons with at least three plasmids represented in both the food and clinical plasmid datasets **Total number of plasmids:** indicates the total of plasmids corresponding to the PTU listed on the left, adding both plasmid datasets. **Number of food plasmids:** lists the plasmid content in each PTU for the food dataset. **Number of clinical plasmids:** lists the plasmid content in each PTU for the clinic dataset **Ratio of clinical vs. food representation:** indicates the representation of clinic plasmids in relationship to food plasmids corresponding to each replicon (% clinical plasmids for a given Inc group divided by the % food plasmids for a given PTU). **JI resistance** indicates the Jaccard Index value for the resistance genes cargo, **JI virulence** indicates the Jaccard Index value for the virulence genes cargo, and **JI total** indicates the Jaccard Index value for the charge of the sum of virulence and resistance genes of the corresponding replicon (See Methods).

Table 2

Representation of ARGs, grouped by families and overlap between food and clinical plasmid datasets.

Plasmid ARG Families	Food	Clinic	Total	Unique to food plasmids				
Beta lactamases	14	58	72	<i>bla_{SHV-12}</i>	<i>bla_{HERA-3}</i>	<i>bla_{LAP-2}</i>		
Aminoglycoside acetyl, phospho, adenylyl transferases	17	33	50	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>aac(3)-IIg</i>	<i>aac(6)-IIc</i>	<i>aadA17</i>	<i>aadA24</i>
Fluoroquinolone resistance	6	16	22	<i>qnrB19</i>	<i>qnrS11</i>			
Trimethoprim resistance		5	14					
Phenol resistance	3	9	12					
Tetracycline resistance	4	8	12					
Macrolide resistance	1	5	6					
Sulfonamide resistance	3	3	6					
Lincosamide resistance	3	3	6					
Colistin resistance	2	3	5	<i>mcr-9.1</i>				
Rifamycin resistance	1	2	3					
Fosfomycin resistance	0	3	3					
RNA methylases	1	2	3					
Eflux pumps	0	3	3					
Glycopeptide resistance	1	1	2					
Nucleoside resistance	1	1	2					

Plasmid ARG Families: lists all ARGs represented in our plasmid database, grouped by families. **Food/Clinic:** number of individual ARGs found in food plasmids/clinical plasmids, including multiple hits of the same ARG. **Total:** adds up the combined number of ARGs. Fosfomycin resistance genes and efflux pumps were exclusively found in clinical plasmids.

3.7. Presence of ARGs of particular interest in food plasmids

We also looked for the presence of ARGs of particular clinical or epidemiological interest in our food plasmids. Among β -lactamases, we detected several ESBL genes conferring resistance to synthetic cephalosporins in food plasmids, notably *bla_{CTX M 15,55,65}*, *bla_{TEM-135,214,215}*, and *bla_{CMY2}*, all of which were also found in clinical isolates. However, the ESBL *bla_{SHV-12}* and the β -lactamases *bla_{LAP-2}* and *bla_{HERA-3}* were found exclusively in food plasmids (Tables 2, S3), in agreement with recent reports of their presence in the food chain (Irrgang et al., 2021; Tadesse et al., 2018). Strikingly, in food plasmids, the widest variety of ESBL resistance genes was mainly found in IncHI (A, 1B, 2A) and IncF plasmid groups (Table S5). While plasmid-borne ESBL resistance has already been widely reported in *E. coli* in livestock and food derived from it, it was previously associated with a broader range of Inc types (Maded and Haenni, 2018a). This exclusive association with two Inc

groups that we see in our food plasmids is unlike clinical plasmids, where ESBL β -lactamases are associated found with almost all plasmid types and most prominent in ColRNA, IncF, IncI, IncN, IncX, IncH, NT, and p0111 (Table S5). The Inc group promiscuity for β -lactamases observed in clinical plasmids may have facilitated the β -lactamase diversification mentioned above.

Aminoglycoside resistance genes were widely prevalent in both food and clinical isolates. Approximately 70% of the genes were shared in both populations. In food plasmids, we found three classes of aminoglycoside-modifying enzymes: acetyltransferases (aac), phosphoryltransferases (aph) and adenylyltransferases (aad), with *aph(3'')-Ib* (21.8%), *aadA1* (20.0%), *aadA2* (18.1%), *aph(6)-Ib* (18.1%) and *aac(3)-IId* (16.3%) being the mainly detected genes. No nucleotidyltransferases (ant) nor the *rmtB*, *rmtC* and *armA* genes were found. The following five genes: *acc(3)-IIa*, *aac(3)-IIg*, *aac(6)-IIc*, *aadA17*, and *aadA24* were present only in food (Table 2). Aminoglycoside resistance gene cargo

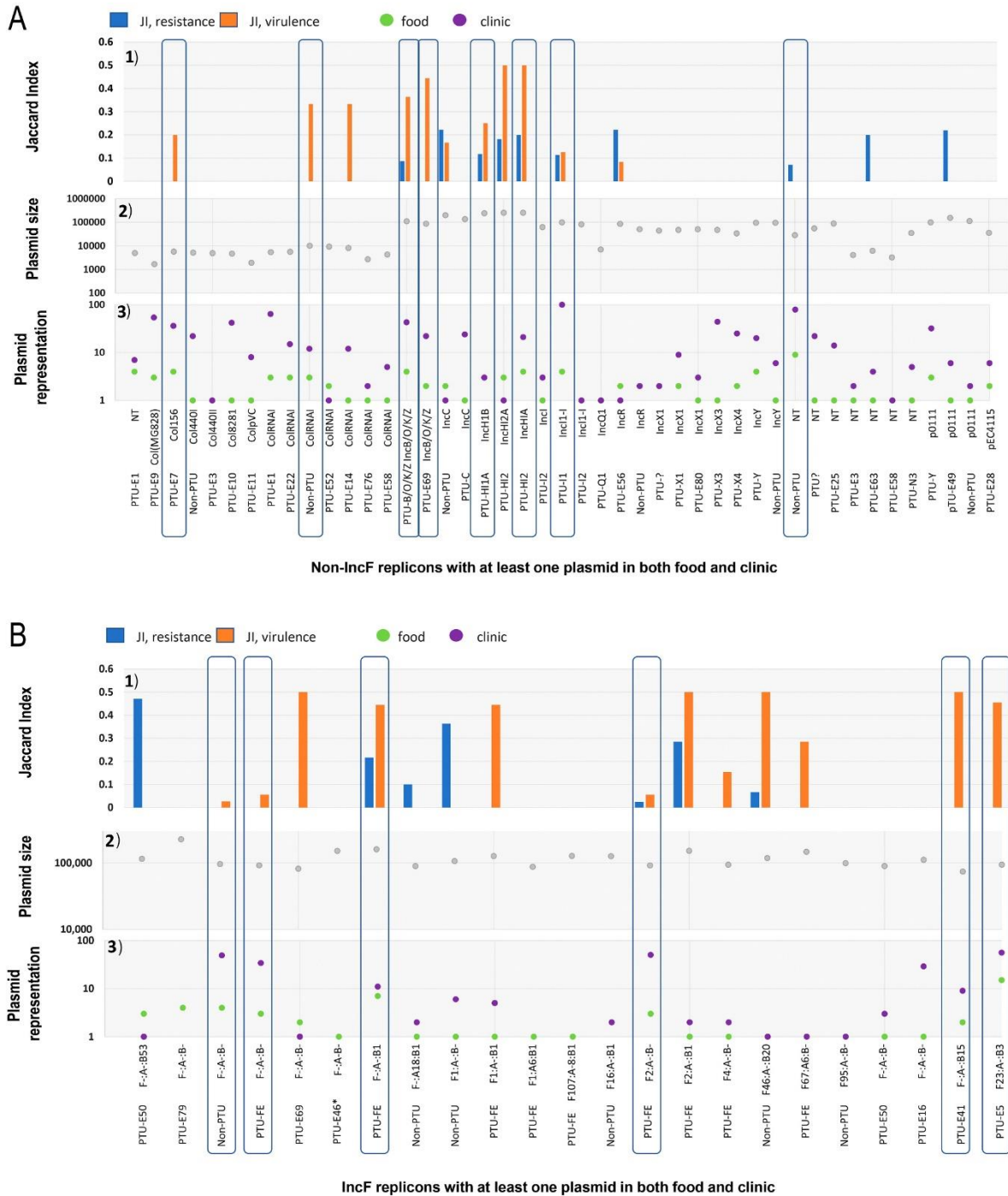


Fig. 5. Resistance and virulence factor overlap, broken down by specific PTU-Inc group combinations. The X axis lists PTU-Inc group combinations with representation in both food and clinical sources. Panel A. Non-IncF replicons; Panel B. IncF replicons. 1) Jaccard Index (JI) of resistance (blue bars) and of virulence (orange bars) as an indicator of genetic overlap between food and clinical plasmids. Values range between 0 (no overlap) and 1 (complete overlap). Note that the large difference in sample size between the two groups of plasmids, biases the index against overlap. 2) Shows the average size (bp) of plasmids assigned to each of the PTU-Inc group combination listed on the X axis (light gray dots). 3) The number of plasmids identified in for each PTU-Inc group combination broken down by source, food (green dots), and clinical (purple dots).

Table 3
Gene Content for the PTU-Inc Combinations with high Jaccard Index.

PTU-Inc Combinations	Resistance	Virulence
PTU-B/O/K/Z IncB/O/K/Z	aph(6)-Id , <i>aph(3'')-Ib</i>	<i>cia</i> , <i>cib</i> , <i>ehxA</i> , <i>epeA</i> , <i>espP</i> , <i>iha</i> , <i>subA</i> , <i>traT</i>
PTU-HI2 IncHIA	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA22</i> , <i>mcr-1.1</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>arr-2</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>dfr14</i> , <i>linG</i> , <i>qnrS1</i> , <i>mphA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>	<i>terC</i>
Non-PTU ColRNAI		<i>cea</i>
PTU-E69 IncB/O/K/Z		<i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>toxB</i> , <i>katP</i>
PTU-HI2 IncHI2A	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>mcr-1.1</i> , <i>sul3</i> , <i>tet(A)</i>	–
PTU-FE F:A :B1	<i>aac(3)-IId</i> , <i>aph(3')-IIa</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>tet(A)</i>	<i>cvaC</i> , <i>ehxA</i> , <i>etsC</i> , <i>hlyF</i> , <i>iroN</i> , <i>iss</i> , <i>iucC</i> , <i>iutA</i> , <i>mchE</i> , <i>ompT</i> , <i>sitA</i> , <i>traT</i> , <i>tsh</i>
PTU-E41 F:A-B15	–	<i>ehxA</i> , <i>etpD</i> , <i>traT</i> , <i>etpP</i> , <i>nleA</i> , <i>cia</i>
PTU-E5 F23:A-B3	–	<i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>etpD</i> , <i>toxB</i> , <i>katP</i>

PTU-Inc Combinations: PTU-Replicon combinations with high Jaccard Index are listed. **Resistance:** indicates the resistance genes contained in the plasmids assigned to the corresponding PTU-Replicon combination. **Virulence:** lists the virulence genes carried by the plasmids assigned to the corresponding PTU-Replicon combination. **Bold**, genes that are found in more than one PTU-Inc group category.

was carried mainly in IncF plasmids in both groups.

Carbapenems are used exclusively in the human clinic; however, there are increasing reports of carbapenem-resistant *E. coli* isolates outside hospital environments. Isolates producing the NDM-5 carbapenemase have previously been reported in food animals such as cows, poultry, and swine but these were mainly carried by IncX3 plasmids; (Tang et al., 2019; He et al., 2017; Wang et al., 2022). Here we report a *bla*_{NDM-5} gene on an IncF (F1:A⁻:B⁻) plasmid (pF070, AP023237. 1) isolated from a pork sample; this plasmid was already reported in an isolate from a Japanese resident (Sugawara et al., 2021). Fig. S8 compares the genetic layout of the 26 plasmids (food and clinical) that carry NDM-5 in our study. This includes six IncX3 plasmids of clinical origin and a variety of IncF subtypes associated with the same PTU (PTU-FE). In terms of their genetic environment, all our NDM-5-bearing plasmids fall into four different categories (a to d) based on the analysis of gene structures, mainly the presence of specific ISs in the vicinity, but also the presence or absence of the following key genes: *ble*_{MBL} (bleomycin resistance gene), *trpF* (phosphoribosylanthranilate isomerase), *dsbD* (disulfide interchange protein) and of hypothetical proteins of different lengths (see **Methods**).

Colistin is a polymyxin antibiotic widely used in veterinary medicine and for which plasmid-mediated-resistance has recently emerged (Skov and Monnet, 2016). This development is of particular concern, since colistin is the antibiotic currently used as a last resort (Ahmed et al., 2020). In our food plasmids, we found two plasmid-mediated colistin resistance genes: *mcr-1.1*, and *mcr-9.1* carried in IncHIA (both) and IncI plasmids (*mcr-1.1* only) (Table S5 and Fig. S9). While a greater variety of types were found associated with *mcr-1.1* in clinical plasmids, IncHIA and IncI plasmids still represented 79% of all the plasmids bearing one of these genes, confirming the strong association between *mcr-1.1*, and *mcr-9.1* and these two replicons. This observation is consistent with previous reports from around the world (Kim et al., 2022; Darphorn et al., 2021; Matamoros et al., 2017). One of the PTU Inc-group combinations with high resistance JI (PTU-HI2 IncHIA) was associated with *mcr-1.1* in food and clinical plasmids, suggesting that group of phylogenetically-related plasmids likely acts as facilitator of horizontal gene transfer of colistin resistance between food and the clinic.

3.8. Plasmid virulence cargo

We identified 72 known virulence genes in our complete plasmid dataset. The average number of virulence genes per plasmid was higher in clinical plasmids (4 virulence factors on average, compared to 3 for food plasmids), but the overall distribution of number virulence genes/plasmid was similar (no statistical difference, $p > 0.5$). Of these 72 virulence genes, 33 overlapped between the two plasmid pools and only five of them were unique to food plasmids. Interestingly, these five genes (*afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaE8*, and *fim41a*) are all involved in adhesion; adhesins have been reported to facilitate the colonization of the small

intestine during infection in DAEC (Diffuse-Adherent *Escherichia coli*) and uroepithelium in UPEC infections (Uropathogenic *Escherichia coli* strains) (Ageorges et al., 2020; Servin, 2005). While most proteins that are present on the bacterial cell surface are encoded chromosomally (typically in genomic islands), they have also been reported on plasmid DNA (Sarowska et al., 2019). In our study, strain 18SC04V04-EC (CP063739.1) showed characteristics of a STEC/ExPEC heterohybrid, as it harbors two Stx1 variants, and a plasmid (pVPS18EC0467-2; CP063740.1) carrying virulence genes (*afaABCDEF*, *cdtB*, *espP*, *iha*, *iucC*, *iutA*, *ompT* and *traT*); this heterotype has already been reported in several clinical patients and production animals (De Rauw et al., 2019; Coite et al., 2018) but not in food. These findings increase the concerns of HGT of virulence factors in the food chain and highlight the need for a more extensive analysis of plasmids in food strains with ST and non-classical serotypes or pathotypes of human infections.

Table S6 shows the virulence genes found in food and clinical plasmids, ranked by frequency. The most frequent virulence genes shared between the two populations are *traT*, *sitA*, *iucC*, *ompT*, and *hlyF*. *SitA* and *iucC* have been reported to play a role in iron sequestration and regulation of metabolism in ExPEC strains (Sarowska et al., 2019). The gene *ompT* encodes a well-characterized integral membrane endopeptidase described as participating in the adhesion to host epithelial cells in ExPEC, APEC, and DAEC strains (Kukkonen and Korhonen, 2004; Torres et al., 2020; Wolfgang et al., 2017); *hlyF* is a hemolysin contributing to ExPEC virulence by regulating toxin release during the establishment of infection (Gigliucci et al., 2019; Murase et al., 2016). Finally, *traT* is a gene encoding for an outer membrane lipoprotein whose expression has been linked to enhanced serum resistance, although the mechanism has not been clearly described (Koraimann, 2018). Two genes appear to be enriched in food plasmids relative to clinical plasmids *espP*, and *ehxA*. The gene *espP* (along with *etpD* and *katP*) has been previously described in plasmid pO157 associated mainly with EHEC and ETEC isolates (Yang et al., 2017). The enterohemolysin *ehxA* has been cataloged of importance in STEC strains (Lorenz et al., 2016).

3.9. Linkage between virulence cargo, Inc groups, and PTUs

We looked at the linkage of virulence cargo to specific Inc groups and their relative presence in food plasmids (Supplementary figs. S5 and S6). Virulence genes are overrepresented in IncR, IncH1B, both of which also had an overrepresentation of ARG genes in food. To a lesser degree, virulence factors are also overrepresented in food plasmids classified in the following Inc groups: ColRNA, IncB/O/K/Z, IncHI2, IncY and IncF (F23:A⁻:B3).

We also looked at the association of virulence factors with Inc groups, grouped by functional categories (Fig. 6). We noted a stronger association of virulence factors with specific replicons in food plasmids, compared with clinical plasmids. The adhesins that we found on our

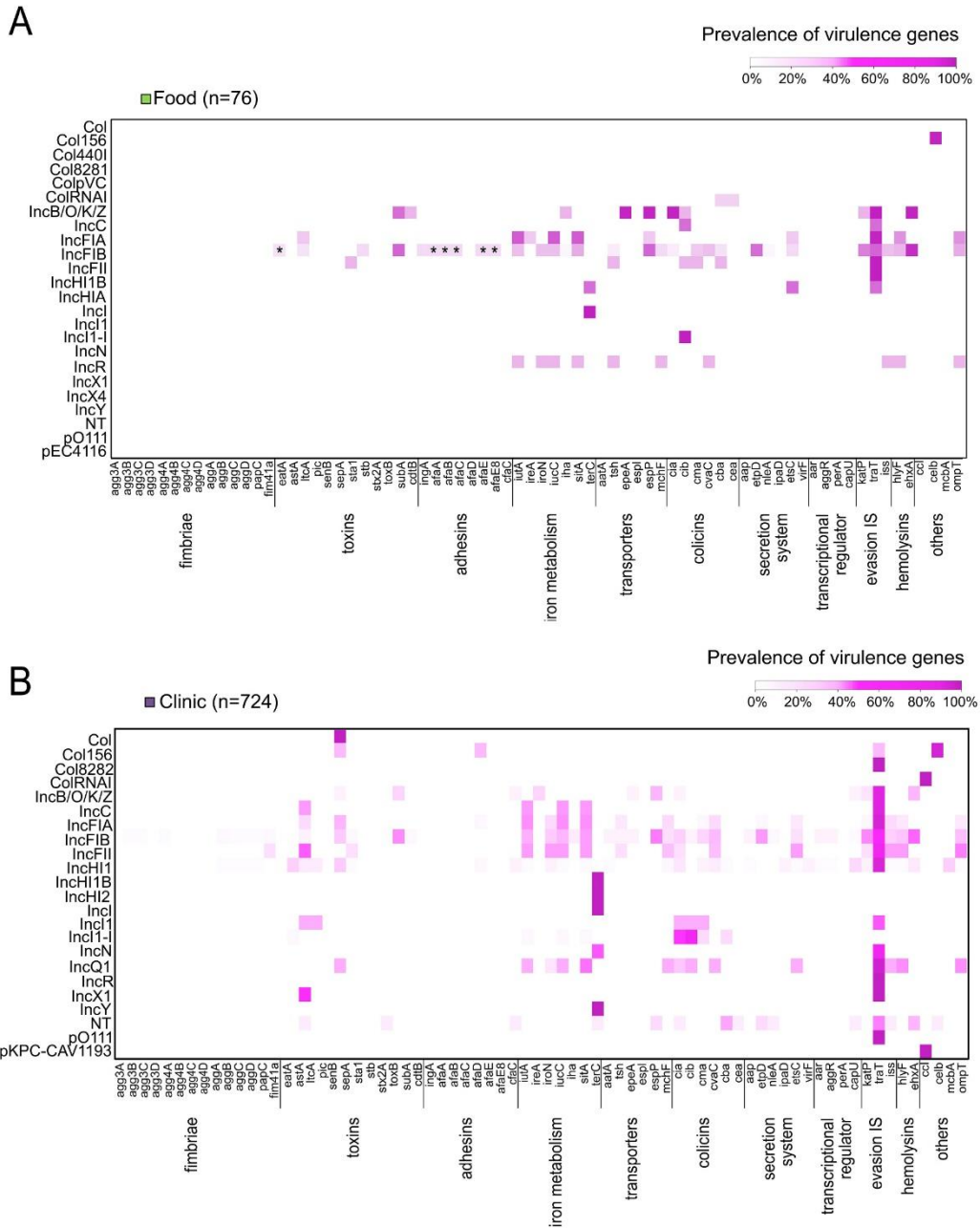


Fig. 6. Association between virulence gene content and Inc type. A. Food plasmids. B. Clinical plasmids. The association between virulence genes listed on the X-axis (grouped by categories) and plasmids carrying specific replicons as defined by PlasmidFinder listed on the Y-axis is shown as a heatmap. The intensity of the pink color is proportional to the prevalence of the gene-Inc type association. A. Food plasmids (n = 76). B. Clinical plasmids (n = 724). *plasmids found exclusively in food strains.

database, which as we mentioned above are exclusive to the food plasmids, exhibit a striking association with IncF (subtypes F⁻:A⁻:B⁻ and F74: A⁻:B⁻) replicons. Virulence factors involved in iron metabolism, by contrast, are associated with a wide range of replicons.

To determine the overlap between virulence factors found in food and clinical plasmids for individual Inc groups, we calculated a JI for

virulence (see **Methods**). The results for Inc types that have at least three plasmids in food and three plasmids in the clinic are shown in **Table 1A**. JI values range between 0 and 0.45, with an average of 0.133. Three Inc types stand out: IncF(F23:A⁻:B3)(JI = 0.45), IncF(F⁻:A⁻:B⁻)(JI = 0.40), and IncB/O/K/Z (JI = 0.33). Note that, compared to ARGs, virulence factors produce much higher JI values. This is at least partially

Table 4

Summary of the specific associations Inc group, PTU or PTU- Inc group combinations for food plasmids and associations with high resistance and/or virulence cargo overlap between food and clinical plasmids.

Characteristics	Food	Food and clinic: high overlap	Food and clinic: other PTU-Inc overlap;
General Inc type overrepresentation	IncR, IncHI1B, IncX1, IncF(F ⁻ :A ⁻ :B1), IncF(F23:A ⁻ :B3)		
General PTU overrepresentation	PTU-HI1A, PTU-E50, PTU-E52. Unique to food plasmids PTU-E46, PTU-E54, PTU-E79		
ARG: Inc type overrepresentation	IncR, IncHI1B IncF(F1:A ⁻ :B ⁻)		
ARG: high Inc type JI		IncR, p0111, IncX1, IncI-1 IncF(F ⁻ :A ⁻ :B1)	
ARG: high PTU JI		PTU-E50, PTU-HI2, PTU-FE	
ARG: high JI Inc type-PTU		<u>PTU-B/O/K/Z IncB/O/K/Z</u> PTU-HIA IncHI1B PTU-HI2 IncHIA PTU-FE IncF(F ⁻ :A ⁻ :B1)	PTU-I1 IncI1-1 Non-PTU NT PTU-FE IncF(F2:A ⁻ :B ⁻)
Virulence: Inc type overrepresentation	IncR, IncHI1B, ColRNAI, IncB/O/K/Z, IncHI2, IncY and IncF(F23:A ⁻ :B3)		
Virulence: PTU overrepresentation			
Virulence: high Inc type JI		Inc-B/O/K/Z IncF(F23:A ⁻ :B3) IncF(F ⁻ :A ⁻ :B ⁻)	
Virulence: high PTU JI		PTU-HI2, PTU-E5, PTU-FE, PTU-B/O/K/Z	
Virulence: high JI Inc type-PTU		<u>PTU-B/O/K/Z IncB/O/K/Z</u> PTU-E69 IncB/O/K/Z PTU-HI2 IncHIA Non-PTU ColRNAI <u>PTU-FE IncF(F⁻:A⁻:B1)</u> PTU-FE IncF(F23:A ⁻ :B3) PTU-E41 IncF(F ⁻ :A ⁻ :B15)	PTU-E7 Col156 <u>PTU-HIA IncHI1B</u> Non-PTU IncF(F ⁻ :A ⁻ :B ⁻) PTU-FE IncF(F ⁻ :A ⁻ :B ⁻)

PTU-Inc group combinations exhibiting overlap for both virulence and resistance genes are underlined.

due to the reduced genetic pool involved (72 genes, compared to 175).

We also calculated the JI for virulence cargo for individual PTU types Table 1B and the highest values went up even further (up to 0.5). The PTUs that stand out for their high values were PTU-HI2 (JI = 0.5), PTU-E5 (0.45), PTU-FE (JI = 0.41) and PTU-B/O/K/Z (JI = 0.36). As in the case of ARGs, this result suggests that certain PTUs dominate the genetic exchange of virulence factors between food and clinic strains, although the fact that only two of the PTUs overlap between the ARG and virulence (PTU-FE and PTU-HI2) suggests some specialization for the HGT of virulence factors.

To increase granularity in our analysis, we determined the virulence JI for Inc groups within individual PTUs, the results are shown in Fig. 5. The plasmid representation in each compartment is shown in section 3) of Fig. 5A and Fig. 5B to give a sense of the significance of the JI. Based on these considerations, the following PTU-replicon combinations appear to have genuine overlap in gene content between food and clinical plasmids: PTU-HI2 IncHIA (JI = 0.5, with 4 plasmids for food and 21 for the clinic), PTU-E69 Inc B/O/K/Z (JI = 0.44, with 2 plasmids for food and 22 for the clinic), PTU-B/O/K/Z Inc B/O/K/Z (JI = 0.36, with 4 plasmids for food and 43 for the clinic), and non-PTU ColRNAI (JI = 0.33, with 3 and 12 plasmids in each compartment, respectively). Within IncF plasmids, the following PTU-Inc combinations stand out: PTU-E41 IncF(F⁻:A⁻:B15) (JI = 0.5, with 2 food plasmids and 9 clinical plasmid), PTU-E5 IncF(F23:A⁻:B3) (JI = 0.45, with 15 food plasmids and 56 clinical plasmids), and PTU-FE IncF(F⁻:A⁻:B1) (JI = 0.44, with 7 food plasmids and 11 clinical plasmids). Supplemental fig. S7 shows the dendrograms for plasmids belonging to five of these PTU-Inc group combinations, and in all cases we see that plasmids found in food are more closely related to plasmids found in the clinic than to each other, strongly supporting a direct plasmid exchange between the two compartments.

The specific virulence factors that are found to be overlapping in these PTU-Inc categories exhibiting high JI indexes are listed in Table 3. The enterohemolysin gene *ehxA* stands out because it is found in five out of the 8 categories, and it is one of the virulence genes that is overrepresented in food plasmids. This observation suggests that the enrichment for this virulence factor in food is likely facilitated by horizontal transfer via plasmids.

Note that if there is plasmid-mediated HGT between food and clinical strains, some of the vectors (particularly large ones) would be expected to transfer resistance and virulence genes in the same HGT event. Indeed, if we look at our PTU-Inc group analysis, three of the eight PTU-Inc combinations of interest overlap, notably: PTU-B/O/K/Z Inc B/O/K/Z (JI = 0.09 for resistance, 0.36 for virulence), PTU-HI2 IncHIA (JI = 0.2 for resistance, 0.5 for virulence), and PTU-FE IncF(F⁻:A⁻:B1) (JI = 0.21 for resistance and 0.44 for virulence). Other PTU-Inc combinations with substantial JI for both resistance and virulence include: PTU-HI1A IncHI1B (JI = 0.11 for resistance, 0.25 for virulence, 3 plasmids in each compartment) and PTU-I1 IncC I1-I (JI = 0.11 and 0.125, with 4 food plasmids and 100 clinical plasmids) (Fig. 5, Table 4).

4. Discussion

This article analyzes the genomic sequence of 77 food *E. coli* isolates (with 161 plasmids); for comparison, we also included 649 clinical isolates (with 1624 plasmids) in our analysis. Admittedly, the two groups of genomes that are being included in this study were not matched for geographic location or timing so we cannot rule out that the observed differences can be attributed to the origin of the samples. The ten-fold difference in sample size between food and clinical strains is not ideal either. It means that the degree to which features from food samples do not overlap with clinical samples is likely an underestimate, whereas the features from clinical samples that do not overlap with food samples are likely overestimated. Having said that, observed overlaps are still informative and so are the genetic associations between genes and Inc groups and/or PTUs because these represent intrinsic, genetically-based properties of the plasmids. Supporting the validity of our observations, most of our observations fit well with and extend previous reports from the literature.

The main goal of this study was to shed light on the role that *E. coli* strains contaminating foods play in human disease. This is a topic that is actively being debated, with some reports supporting the idea of a direct transmission of pathogenic strains via food (Kluytmans et al., 2013; Leverstein-van Hall et al., 2011) and other reports highlighting the role of food strains as reservoirs for resistance and virulence genes (De Been et al., 2014; Sunde et al., 2015) and demonstrating the presence of

plasmids harboring resistance and virulence genes in food strains worldwide (Daphorn et al., 2021; Chuanchuen et al., 2022).

This article takes a rigorous genomic approach to address this question. We found that the vast majority of the strains isolated in food are more closely related to each other than to clinical strains, and that there is very little overlap in sequence types between the two compartments (with the exception of ST11). We also provide very strong evidence of gene exchange between plasmids found in the food and the clinic. Taken together, these two observations strongly suggest that plasmids found in strains of *E. coli* contaminating food represent reservoirs of resistance and virulence genes and facilitate their genetic exchange with clinical strains via HGT. These genomic observations complement studies comparing antibiotic-resistant clinical strains, their mobile genetic elements isolated in the clinic versus strains from food (Day et al., 2019; Dorado-García et al., 2018). These observations also support literature highlighting niche specificity (Yu et al., 2021) and the critical role of horizontal transfer for the spread and maintenance of antibiotic resistance and virulence more generally (Zurfluh et al., 2014; Schultsz and Geerlings, 2012).

We report a large number of resistance and virulence genes in food plasmids. Selective pressures to retain resistance genes in food likely reflect the use of antibiotics as prophylactics, metaphylactics and growth enhancers for food production animals and the subsequent use of manure as a fertilizer for crops (Madec and Haenni, 2018b) or contamination during meat processing (Projahn et al., 2019). We found two resistance genes of high clinical relevance in food plasmids: *mcr 1.1* and *mcr 9.1* (colistin resistance) and *bla_{NDM5}* (carbapenem resistance).

The high number of virulence genes found in food plasmids and the great enrichment for adhesion factors in food plasmids that we found, are remarkable. Pressures to retain virulence genes are likely linked to survival in the host animal (in case of meat and dairy products) or to remaining attached to food surfaces, which could be involved in the adaptation to the food environment.

Here we also report a general landscape for overlaps in the representation of virulence and resistance genes across food and clinical plasmids. The observed overlap suggests that some of the selective pressures operating are shared in both food and the clinic. The overlap is larger for virulence factors, possibly because of more rapid acquisition of resistance genes in the clinic, which increases the number of resistance genes found in clinical plasmids and not in food plasmids. This is likely the result from the more consistent selective pressures that these strains are undergoing in the clinic, where antibiotics are routinely administered for prophylaxis and therapy.

The observed overlap in resistance and virulence genes is enriched in specific Inc groups, further enriched when we look at PTUs, which represent bona fide phylogenetically-related units, and even further enriched when we look at specific PTU-Inc group combinations (Figs. 5, S5 and S6). In addition, food plasmids cluster with clinical plasmids within the PTU-Inc group combinations exhibiting overlaps in resistance and virulence genes (Fig. S7). These observations strongly suggest plasmid-based genetic exchange of resistance and/or virulence cargo across the two ecological compartments (food and clinic). Given that we showed a clear phylogenetic segregation of host strains by source, we have to conclude that the apparent genetic exchange between food and the clinic is the result of HGT.

Consistent with these conclusions, we also showed that food plasmids have a high mobilization potential. This conclusion is based on the presence of complete sets of conjugation genes (over 1/3 of food plasmids are predicted to be competent for conjugation or mobilization) (Fig. 3A) and on their PTU classification, with 25% of food plasmids having a predicted promiscuity at least at the level of family (Fig. 4).

Most conjugative plasmids are large (25–200 kb) in both plasmid populations. The upper size limit could be related to the fitness costs of megaplasmid transfer (Baltrus, 2013). By contrast, a substantial fraction (26.6%) of mobilizable plasmids is made up of small very plasmids (<20 kb). Note that small plasmids tend to have a high copy number. A

possible trade-off between different plasmid sizes would involve two different types of access to genetic diversity, namely mutagenesis (in multicopy plasmids), which allow genetic drift by retaining copies with a wild-type sequence (Rodríguez-Beltrán et al., 2018) or access to the larger gene pool provided by other strains/genus/family/order/class/phyla (conjugation), producing repositories of genes captured from diverse clinical and environmental sources. Indeed, the pool of ARGs in clinical *E. coli* is known to derive from the environmental resistome (Day et al., 2019; Dorado-García et al., 2018).

The specific associations with Inc groups and PTUs are summarized in Table 4. Four Inc groups stand out for their overrepresentation in plasmids, namely IncR, IncHI1B, IncF(F⁻:A⁻:B1), and IncF(F23:A⁻:B3). Plasmids associated with these Inc groups carry a high cargo of resistance and virulence genes (IncR, IncHI1B, IncF(F⁻:A⁻:B1)) or only virulence genes (IncF(F23:A⁻:B3)). IncR and IncF(F⁻:A⁻:B1) plasmids also carry a high proportion of resistance genes that overlap between food and clinical plasmids (Table 4). An IncF(F⁻:A⁻:B1) plasmid has previously been described as one of the most frequent ESBL-producing *E. coli* from community-acquired urinary tract infections and sewage (Soncini et al., 2022; Jarocki et al., 2021), while, IncR plasmid is increasingly described as a multidrug resistance reservoir in different locations of the world (Zhou et al., 2019; Kocsis et al., 2016). In the case of IncHI1B and IncF(F23:A⁻:B3), the overlap is restricted to virulence. In this case, IncHI1B, not only has been reported in *E. coli*, but also in other enterobacteria such as *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella enterica* from patients and animals, mainly carrying resistance genes against beta-lactams (Zurfluh et al., 2014; Bloomfield et al., 2022; Wang et al., 2021). Other Inc groups with high levels of overlap include Col156 (virulence), IncB/O/K/Z (resistance and virulence), IncC (resistance and virulence) Inc I1–I (resistance and virulence), IncX1 (resistance), and p0111 (resistance). These associations are congruent with previous analyses performed showing associations between Inc groups and replicons harboring clinically important resistance genes (Zhang et al., 2019; Wang et al., 2018; Carattoli et al., 2021).

The present work, through the use of COPLA, goes much further in establishing the phylogenetic relatedness between the plasmids involved and their potential for mobilization beyond *E. coli*. We find three PTUs that are exclusively found in food plasmids (PTU-E46, PTU-E54, PTU-E79). This is remarkable given the almost 10-fold difference in plasmid size going against food plasmids. Three additional PTUs are also substantially overrepresented in food plasmids: PTU-H1A, PTU-E50, and PTU-E52. Note that PTU-E50 is associated with a broad host range (Order), which could confer an adaptive advantage.

IncHI1B is associated with PTU-H1A and with virulence and resistance cargo, IncF(F⁻:A⁻:B1) with PTU-FE (resistance and virulence), IncF(F23:A⁻:B3) with PTU-E5 (virulence), Col156 with PTU-E7 (virulence), IncB/O/K/Z with PTU-B/O/K/Z (resistance and virulence) and with PTU-E69 (virulence), Inc I1–I with PTU-I1 (resistance) (Table 4). Other PTU-combinations with significant JI indexes and therefore candidates to mediate horizontal transfer between food and clinical strains are: PTU-FE with IncF(F2:A⁻:B⁻) (resistance and virulence) and with IncF(F⁻:A⁻:B⁻) (virulence), PTU-H12 Inc H1A (resistance and virulence), PTU-E41 IncF(F⁻:A⁻:B15) (virulence) (Table 4). There are also a few Inc groups associated with Non-PTU plasmids (Fig. S10). While there is a substantial number of PTU-Inc group combinations showing a substantial overlap for both resistance and virulence genes, we also see examples of overlap for one type of cargo. This is particularly true for virulence factors, with five PTU-Inc group combinations showing a strong preference for virulence genes (Fig. S10). Note that two of these combinations (the ones with PTU-E7 Col156 and Non-PTU ColRNA) represent very small plasmids of generally <10,000 bp. In this case, size limitations may have driven their specialization for virulence factors.

Our observations highlight the importance of collecting genomic sequences of food isolates from all over the world for epidemiological surveillance and have both basic and translational relevance. The biological significance of Inc groups is still unclear. Given the clear

phylogenetic segregation of food and clinical strains, the preferential association of specific Inc groups with food plasmids suggests some niche-dependent host preference. The same is true for the even stronger preference seen for PTUs, which suggests that PTU evolution is linked to the ecological niche occupied by the host strain.

The high density of virulence genes found in food plasmids (75% that of clinical plasmids), and the high representation of adhesion factors in these plasmids are also of biological relevance and begs the question of what their role is for the maintenance of the host strains in the food chain. Also, one would like to know whether these observations are exclusive to *E. coli* or whether they also apply to other Gram-negatives that frequently contaminate foods such as *Salmonella*. On the translational side, the identification of specific PTU-Inc group combinations that concentrate the majority of the cargo overlap between food and clinical plasmids should facilitate the design of strategies for epidemiological surveillance of *E. coli* contaminating foods. It is important to acknowledge, though, that the movement of genes facilitated by MGE and recombination will diminish the specificity of any association between resistance and virulence genes and specific replicons or PTUs.

Authors and contributors

Maria Balbuena-Alonso: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Visualization and Writing – original draft.

Gerardo Cortés-Cortés: Conceptualization, Resources, Supervision, Visualization and Writing – review & editing.

Jay Kim: Conceptualization, Visualization.

Patricia Lozano-Zarain: Conceptualization, Resources, Visualization.

Manel Camps: Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Resource, Supervision, Visualization, and Writing – review & editing.

Rosa del Carmen Rocha-Gracia: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Visualization, Writing – review & editing.

Funding information

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [CB-2017-2018/A1-S-22136]. The CONACYT also provided a fellowship [589143 to MGBA]. We are also grateful for the UC MEXUS-CONACYT Postdoctoral Fellowship 2017–2019 and the CONACYT National Postdoctoral Fellowship across “Convocatoria de Estancias Posdoctorales por México 2020” during the development of the research to GCC [335026]. JK was supported by CITRIS Seed Funding proposal 2015–324 and by NIAID award 1R41AI122740-01A1 in partnership with Maverix Genomics.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank Miguel Castañeda Lucio, Margarita María de la Paz Hernández Arenas and Candelario Vázquez Cruz from “Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias” of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, for their invaluable contribution, guidance and support to the development of this work. We would also like to thank María Pilar Garcillán-Barcia (University of Cantabria, Spain) for pointing us to COPLA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.j.plasmid.2022.102650>.

References

- Ageorges, V., Monteiro, R., Leroy, S., Burgess, C.M., Pizza, M., Chaucheyras-Durand, F., Desvaux, M., 2020. Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* 44 (3), 314–350. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa008>. May 1.
- El-Sayed Ahmed, Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.-B., 2020. Colistin and its role in the era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg. Microbes Infect.* 9 (1), 868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>. Jan 1.
- Ali Khan, N.-F., Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., Beatson, S.A., 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple Prokaryote Genome Comparisons, p. 408. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>. Aug.12.
- Bakour, S., Sankar, S.A., Rathored, J., Biagini, P., Raouf, D., Fournier, P.-E., 2016. Identification of Virulence Factors and Antibiotic Resistance Markers using Bacterial Genomics, 11 (3), 455–466. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.149>. Mar.
- Baltrus, D.A., 2013. Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol. Evol.* 28 (8), 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.04.002>. Aug 1.
- Baquero, F., Tedim, A.P., Coque, T.M., 2013. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* 4 (MAR) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00015>.
- Baquero, F., Martínez, J.L.F., Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J.C., San Millán, A., Cantón, R., Coque, T.M., 2021. Evolutionary pathways and trajectories in antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 34 (4), 1–72. <https://doi.org/10.1128/cmr.00050-19>. Oct.
- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Le, Nagard H., Denamur, E., Clermont, O., 2018. ClermontTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia coli* strain phylotyping. *Microb. Genom.* 4 (7) <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192> e000192. Jul 1.
- Bloomfield, S., Duong, V.T., Tuyen, H.T., Campbell, J.I., Thomson, N.R., Parkhill, J., 2022. Mobility of antimicrobial resistance across serovars and disease presentations in non-typhoidal *Salmonella* from animals and humans in Vietnam. *Microb. Genom.* 8, 798. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000798>.
- Bolukaoto, J.Y., Kock, M.M., Strydom, K.A., Mbelle, N.M., Ehlers, M.M., 2019. Molecular characteristics and genotypic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Gauteng region, South Africa. *Sci. Total Environ.* 692, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.119>. Nov 20.
- Bortolaia, V., Kaas, R.S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattori, V., Philippon, A., Allesoe, Rebelo, A., Florensa, A., Fagelbauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 75 (12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>. Dec 1.
- Bouet, J.-Y., Funnell, B.E., 2019. Plasmid localization and partition in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus* 8 (2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0003-2019>. Feb 6.
- Cabezon, E., Ripoll-Rozada, J., Peña, A., de la Cruz, F., Arechaga, I., 2015. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.* 39 (1), 81–95. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085>. Jan.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F., Hasman, H., 2014. In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>.
- Carattoli, A., Villa, L., Fortini, D., García-Fernández, A., 2021. Contemporary Inc1 Plasmids involved in the Transmission and Spread of Antimicrobial Resistance in Enterobacteriaceae, 118, p. 102392. <https://doi.org/10.1016/j.j.plasmid.2018.12.001>. Nov.
- Carloni, E., Andreoni, F., Omiccioli, E., Villa, L., Magnani, M., Carattoli, A., 2017. Comparative analysis of the standard PCR-based replicon typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. *Plasmid.* 90, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.01.005>. Mar 1.
- Carroll, A.C., Wong, A., 2018. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can. J. Microbiol.* 64, 293–304. <https://doi.org/10.1016/BS.aambs.2014.09.002>.
- Chuanchuen, R., Puangseree, J., Prathan, R., Srisanga, S., Angkittitrakul, S., 2022. Epidemiology and Infection Plasmid Profile Analysis of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Isolated from Pigs, Pork and Humans, 150. <https://doi.org/10.1017/S0950268822000814> e110. May 10.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (10), 4555. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.
- Clermont, O., C Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>. Feb 1.
- Clermont, O., Gordon, D., Denamur, E., 2015. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology.* 161 (5), 980–988. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000063>.
- Clermont, O., Dixit, O.V.A., Vangchhla, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., Gordon, D., 2019. Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ. Microbiol.* 21 (8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>. Aug 1.
- Cointe, A., Birgy, A., Mariani Kurkdjian, P., Liguori, S., Courroux, C., Blanco, J., Delannoy, S., Fach, P., Loukiadis, E., Bidet, P., Bonacorsi, S., 2018. Emerging multidrug resistant hybrid pathotype Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O80 and

- related strains of clonal complex 165, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 24 (12), 2262–2269. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180272>.
- Darphorn, T.S., Bel, K., Koenders-van Sint Anneland, B.B., Brul, S., Ter Kuile, B.H., 2021. Antibiotic resistance plasmid composition and architecture in *Escherichia coli* isolates from meat. *Sci. Rep.* 11 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81683-w>.
- Day, M.J., Rodríguez, I., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A.-K., Wu, G., Chattaway, M., DoNascimento, V., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, J., Coldham, N., Mevius, D., Woodford, N., 2016. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* 71 (5), 1178–1182. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv485>. May.
- Day, M.J., Hopkins, K.L., Wareham, D.W., Toleman, M.A., Elviss, N., Randall, L., Teale, C., Cleary, P., Wiuff, C., 2019. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect. Dis.* 19 (12), 1325–1335. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30273-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30273-7). Dec 1.
- De Been, M., Lanza, V.F., De Toro, M., Scharringa, J., Dohmen, W., Du, Y., Hu, J., Lei, Y., Li, N., Tooming-Klunderud, Heederik D., Fluit, A., Bonten, M., Willems, R., de la Cruz, F., Van Schaik, W., 2014. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet.* 10 (12) <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004776>, 1004776.
- De Raauw, K., Thiry, D., Caljon, B., Saulmont, M., Mainil, J., Piérard, D., 2019. Characteristics of Shiga toxin producing- and enteropathogenic *Escherichia coli* of the emerging serotype O80:H2 isolated from humans and diarrhoeic calves in Belgium. *Clin. Microbiol. Infect.* 25 (1), 111.e5–111.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.07.023>. Jan 1.
- de Santos, A.C.M., Santos, F.F., Silva, R.M., TAT, Gomes, 2020. Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 0, 339. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>. Jul.
- Dorado García, A., Smid, J.H., Van Pelt, W., Bonten, M.J.M., Fluit, A.C., Van Den Bunt, G., Wagenaar, J., Jordijk, J., Dierikx, C., Veldman, K., De Koijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lan, T., Velthuis, A., 2018. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis, 73 (2), 339–347. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx397>. Feb 1.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P., 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7, 644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>. May.
- Garcillán Barcia, M.P., Francia, M.V., de La Cruz, F., 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (3), 657–687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>.
- Garcillán Barcia, M.P., Redondo Salvo, S., Vielva, L., de la Cruz, F., 2020. MOBscan: Automated annotation of MOB relaxases. In: *Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.*, pp. 295–308.
- Gigliucci, F., van Hoek, Angela, Chiani, Paola, Knijff, Arnoldo, Minelli, Fabio, Scavia, Gaia, Franz, Eelco, Morabito, Stefano, Michelacci, V., 2019. Genomic Characterization of hlyF-positive Shiga toxin – Producing *Escherichia coli*, Italy and the Netherlands, 2000–2019, 27(3), pp. 1–6. <https://doi.org/10.3201/eid2703.203110>.
- Guillard, T., Pons, S., Roux, D., Pier, G.B., Skurnik, D., 2016. Antibiotic resistance and virulence: understanding the link and its consequences for prophylaxis and therapy. *BioEssays.* 38 (7), 682–693. <https://doi.org/10.1002/bies.201500180>. Jul.
- He, T., Wei, R., Zhang, L., Sun, L., Pang, M., Wang, R., Wang, Y., 2017. Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Vet. Microbiol.* 207, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.010>. Aug 1.
- Hong, Y., Guo, M., Wang, J., 2021. ENJ algorithm can construct triple phylogenetic trees. *Mol. Ther. Nucl. Acid.* 23, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.11.004>.
- Hughes, D., Andersson, D.I., 2017. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 579–596. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093813>.
- Irgang, A., Zhao, G., Juraschek, K., Kaesbohrer, A., Hammerl, J.A., 2021. Characterization of *E. coli* isolates producing extended spectrum beta Lactamase SHV-Variants from the food chain in Germany. *Microorg* 9 (9), 1926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091926>. Sep 10.
- Jarocki, V.M., Heß, S., Anantanawat, K., Berendonk, T.U., Djordjevic, S.P., 2021. Multidrug resistant lineage of enterotoxigenic *Escherichia coli* ST182 with serotype O169:H41 in airline waste. *Front. Microbiol.* 12 (September), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.731050>.
- Joensuu, K.G., Tetzschner, A.M.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M., Scheut, F., 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 53 (8), 2410–2426. <https://doi.org/10.1128/jcm.00008-15>. Aug 1.
- Johansson, M.H.K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F.M., Roberts, A.P., Petersen, T.N., 2021. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder, 76 (1), 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>. Jan.
- Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2014. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>, 104984.
- Kim, Y.-J., Seo, K.-H., Kim, S., Bae, S., 2022. Phylogenetic comparison and characterization of an mcr-1 harboring complete plasmid genome isolated from Enterobacteriaceae, 28 (4), 492–497. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0164>. Apr.
- Kluytmans, J.A.J.W., Overdeest, I.T.M.A., Willemsen, I., Kluytmans Van Den Bergh, M., F.Q., Van Der Zwaluw, K., Heck, M., Rijnsburger, M., Vandenbroucke-Grauls, C., Savelkoul, P., Johnston, B., Gordon, D., Johnson, J., 2013. Extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin. Infect. Dis.* 56 (4), 478–487. <https://doi.org/10.1093/cid/cis929>. Feb 15.
- Kocsis, E., Gužvinec, M., Butić, I., Krešić, S., Crnek, S.S., Tambić, A., 2016. blaNDM-1 carriage on IncR plasmid in Enterobacteriaceae strains. *Microb. Drug Resist.* 22 (2), 123–128. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0083>.
- Koraimann, G., 2018. Spread and persistence of virulence and antibiotic resistance genes: a ride on the F plasmid conjugation module. *EcoSal Plus* 8 (1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP.0003.2018>. Feb 8.
- Kukkonen, M., Korhonen, T.K., 2004. The ompT family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 294 (1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.01.003>.
- Lehtinen, S., Huisman, J.S., Bonhoeffer, S., 2021. Evolutionary mechanisms that determine which bacterial genes are carried on plasmids. *Evol. Lett.* 5 (3), 290. <https://doi.org/10.1002/evl3.226>. Jun 1.
- Leticia, I., Bork, P., 2016. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44 (W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>. Jul.
- Leverstein van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J., Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A., van de Sande-Bruinsma, Scharinga J., Bonten, M., Mevius, D., 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (6), 873–880. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>. Jun 1.
- Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., Ou, H., 2018. OriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1), W229–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gky352>. Jul 2.
- Lorenz, S.C., Monday, S.R., Hoffmann, M., Fischer, M., Kase, J.A., 2016. Plasmids from Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains with rare enterohemolysin gene (ehxA) subtypes reveal pathogenicity potential and display a novel evolutionary path. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (21), 6367. <https://doi.org/10.1128/aem.01839.16>.
- Ludden, C., Raven, K.E., Jamrozny, D., Gouliouris, T., Blane, B., Coll, P., de Gorfauas, M., Naydenova, P., Horner, C., Hernandez-Garcia, J., Wood, P., Hadjiri, N., Radacovic, M., Brown, N., Holmes, M., Parkhill, J., Peacock, S., 2019. One health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *MBio* 10 (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02693.18>. Jan 1.
- Madec, J.Y., Haenni, M., 2018a. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid.* 99, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.001>. Sep 1.
- Madec, J.Y., Haenni, M., 2018b. Antimicrobial resistance plasmid reservoir in food and food-producing animals. *Plasmid.* 99, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.001>. Sep 1.
- Matamoros, S., Van Hattem, J.M., Arcilla, M.S., Willemsen, M., Melles, D.C., Penders, J., Nguyen, V., Hoa, N., Bootsma, M., Van Genderen, P., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Lashof, A., Stobbering, E., Verbrug, H., De Jong, M., Schultz, C., 2017. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction, 7 (1), 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>. Nov.
- Mathers, A.J., Peirano, G., Pitout, J.D.D., 2015. *Escherichia coli* ST131: the quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv. Appl. Microbiol.* 90, 109–154. <https://doi.org/10.1016/Bs.aambs.2014.09.002>. Jan 1.
- Muniesa, M., Hammerl, J.A., Hertwig, S., Appel, B., Brissou, H., 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (12), 4065–4073. <https://doi.org/10.1128/aem.00217-12>. Jun.
- Munson, G.P., 2013. Virulence regulons of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunol. Res.* 57 (1), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8453-4>. Nov.
- Murase, K., Martin, P., Porcheron, G., Houle, S., Hellein, E., Pénary, M., Nougayrède, J., Philippe, D., Hayashi, T., Oswald, E., 2016. HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. *J. Infect. Dis.* 213 (5), 856–865. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv506>. Mar 1.
- Nguyen, M.N., Hoang, H.T.T., Xavier, B.B., Lammens, C., Le, H.T., Hoang, N.T.B., Nguyen, S., Phan, N., Goossens, H., Dang, A., Malhotra-Kumar, S., 2021. Prospective one health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct blaCTX-M-harboring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 27 (10) <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.006>. P1515.E1–1515.E8.
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., Madec, J.-Y., 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (3), 543. <https://doi.org/10.1128/cmr.00125-13>.
- Nojoomi, F., Ghasemian, A., 2019. The relation of phylogroups, serogroups, virulence factors and resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from children with septicemia. *New Microbes New Infect.* 29 <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100517>, 100517. May 1.
- Novick, R.P., 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* 51 (4), 381. <https://doi.org/10.1128/mr.51.4.381-395.1987>.
- Oteo, J., Cerenado, E., Cuevas, Ó., Bautista, V., Delgado-Iribarren, A., Orden, B., Pérez-Vázquez, M., García-Cobos, S., Campos, J., 2010. AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY 2–producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to

- the international clone O25b-ST131. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67 (3), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.008>. Jul 1.
- Page, A.V., Liles, W.C., 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic Uremic Syndrome. *Medical Clinics of North America*, 97(4). Elsevier, pp. 681–695. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.04.001>. Jul.
- Palmer, A.C., Kishony, R., 2013. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Genet.* 14 (4), 243. <https://doi.org/10.1038/nrg.3351>. Apr.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev. Am. Soc. Microbiol.* 31, 1–63. <https://doi.org/10.1128/cmr.00088.17>. Oct.
- Poirel, L., Mavec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, F., 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 6 (4), 1–32. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026.2017>. Jul.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix, 26 (7), 1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>. Jul.
- Projahn, M., Von Tippelskirch, P., Semmler, T., Guenther, S., Alter, T., Roesler, U., 2019. Contamination of Chicken Meat with Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during Scalding and Defeathering of Broiler Carcasses, 77, pp. 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.010>. Feb.
- Ramirez, M.S., Traglia, G.M., Lin, D.L., Tran, T., Tolmashy, M.E., 2014. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. *Microbiol. Spectr.* 2 (5) <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0016-2013>. PLAS-0016-2013. Sep.
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E.P.C., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., 2020. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat. Commun.* 11 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17278-2>. Dec.
- Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K.A., Webb, H.E., Fernández-López, R., de la Cruz, F., 2021. COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinform.* 22 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12859-021-04299-X>, 221. 2021 Jul 31.
- Reid, C.J., McKinnon, J., Djordjevic, S.P., 2019. Clonal ST131-H22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microb. Genom.* 5 (9) <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000295>.
- Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M., 2016. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole genome sequencing? *Front. Cell. Infect. Microbiol. Front. Media S.A.* 6 (141). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>.
- Rodríguez Beltrán, J., Hernandez Beltrán, J.C.R., Delafuente, J., 2018. Multicopy Plasmids Allow Bacteria to Escape from Fitness Trade-Offs during Evolutionary Innovation, 5, pp. 873–881. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0529-z>.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D., Hordijk, 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>.
- Sarowska, J., Futoma Koloch, B., Jama Kmiecik, A., Frej Madrzak, M., Książczyk, M., Bugla-Płoskowska, G., Choroszy-Krol, I., 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 11 (1) <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>. Feb 21.
- Schultsz, C., Geerlings, S., 2012. Plasmid-mediated resistance in enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* 72 (1), 1–16. <https://doi.org/10.2165/11597960-000000000-00000>.
- Seemann, T., 2014. Genome analysis Prokka: rapid prokaryotic genome annotation, 30 (14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Servin, A.L., 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2), 264–292. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.2.264-292.2005>.
- Singer, R.S., 2015. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. *Front. Microbiol.* 4 (6), 28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00028>. Feb.
- Skov, R.L., Monnet, D.L., 2016. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (mcr-1 Gene): Three Months Later, the Story Unfolds, 21(9), p. 30155. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.9.30155>.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., de la Cruz, F., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (3), 434. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00020-10>. Sep.
- Soncini, J.G.M., Cerdeira, L., Sano, E., Koga, V.L., Tizura, A.T., Tano, Z.N., Nakazato, G., Kobayashi, R., Aires, A., Lincopan, N., Vespero, E., 2022. Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in southern Brazil. *Sci. Rep.* 12 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13197-y>.
- Sugawara, Y., Hagiya, H., Akeda, Y., Takeuchi, D., Sakamoto, N., Matsumoto, Y., Mootoka, D., Nichi, I., Tomono, K., Hamada, S., 2021. Community spread and acquisition of clinically relevant *Escherichia coli* harbouring bla_{NDM} among healthy Japanese residents of Yangon, Myanmar. *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (6), 1448–1454. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab070>. May 12.
- Sunde, M., Skov Simonsen, G., Slettebø, J.S., Bøckerman, I., Norström, M., 2015. Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs, 10 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128797> e0128797. Jun 5.
- Tadesse, D.A., Li, C., Mukherjee, S., Hsu, C. H., Jones, S.B., Gaines, S.A., Kabera, C., Lonegaran, G., Torrence, M., Harhay, D., McDermott, P., Zhao, S., 2018. Whole genome sequence analysis of CTX-M containing *Escherichia coli* isolates from retail meats and cattle in the United States. *Microb. Drug Resist.* 24 (7), 939–948. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0206>. Sep 1.
- Tang, B., Chang, J., Cao, L., Luo, Q., Xu, H., Lyu, W., Qiang, M., Ji, X., Zhang, Q., Xia, X., Yang, H., 2019. Characterization of an NDM 5 carbapenemase producing *Escherichia coli* ST156 isolate from a poultry farm in Zhejiang, China, 19 (1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1454-2>. Apr.
- Tetzschner, A.M.M., Johnson, J.R., Johnston, B.D., Lund, O., Scheutz, F., 2020. In silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 58 (10) <https://doi.org/10.1128/jcm.01269.20>. Oct 1.
- Torres, A.N., Chamorro-Veloso, N., Costa, P., Cádiz, L., Del Canto F., Venegas, S.A., Nitsche, M., Coloma-Rivero, R., Montero, D., Vidal, R., 2020. Deciphering Additional Roles for the EF-Tu, I-Asparaginase II and OmpT Proteins of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, 8(8), p. 1184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081184>. Aug.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A., 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants, 65 (12), 2518–2529. <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>. Dec.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., Lesterlin, C., 2020. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes (Basel)* 11 (11), 1–33. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>. Nov 1.
- Wang, J., Zeng, Z.-L., Huang, X.-Y., Ma, Z.-B., Guo, Z.-W., Lv, L.-C., 2018. Evolution and Comparative Genomics of F33:A:B Plasmids Carrying bla_{CTX-M55} or bla_{CTX-M65} in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Animals, Food Products, and Humans in China, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00137-18> e00137-18. Jul 18.
- Wang, Y., Zhu, B., Liu, M., Dong, X., Ma, J., Li, X., 2021. Characterization of IncHIIB plasmids encoding efflux pump TmxCd2-ToprJ2 in Carbapenem-resistant *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae*, and *Klebsiella michiganensis* strains. *Front. Microbiol.* 12 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.759208>, 759208. Oct 6.
- Wang, S., Cheng, G., Yu, Y., R s, Y., Z y, Q., X p, L., Kuang, X., Zhang, Y., Liu, J., Yang, R., Qiu, Z., Sun, J., Liao, X., Liu, Y., 2022. Molecular epidemiology of New Delhi metallo-β-lactamase producing *Escherichia coli* in food-producing animals in China. *Front. Microbiol.* 13, 912260 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.912260>.
- Werisch, M., Berger, U., Berendonk, T.U., 2017. Conjugative Plasmids Enable the Maintenance of Low Cost Non-Transmissible Plasmids, 91, pp. 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.04.004>.
- Wolfgang, M.C., Anderson, G., Hassan, H.M., Nolan, L.K., Barbieri, N.L., Vande Vorde, J. A., 2017. FNR regulates the expression of important virulence factors contributing to the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1, 265. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00265>.
- Yamaji, R., Friedman, C.R., Rubin, J., Suh, J., Thys, E., McDermott, P., Hung, F., Riley, L., 2018. A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. *mSphere* 3 (4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00179-18> e00179-18. Aug 29.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Aljuffali, I.A., Fang, J.Y., 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch. Microbiol.* 199 (6), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>.
- Yu, D., Banting, G., Neumann, N.F., 2021. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*, 67 (8), 553–571. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>. Aug.
- Zhang, Q., Lv, L., Huang, X., Huang, Y., Zhuang, Z., Lu, J., 2019. Rapid Increase in Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Retail Meat Driven by the Spread of the bla_{NDM-5}-Carrying IncX3 Plasmid in China from 2016 to 2018, 63(8). <https://doi.org/10.1128/AAC.00573-19> e00573-19. Jul 25.
- Zhou, D., Nawaz, M., Xiong, Y., Haenni, M., Bai Baili, L., Cfsanetcn, Zengqi Yang, 2019. Characterization of five *Escherichia coli* isolates co-expressing ESBL and mcr-1 resistance mechanisms from different origins in characterization of five *Escherichia coli* isolates co-expressing ESBL and mcr-1 resistance mechanisms from different origins in China. *China Front. Microbiol.* 10, 1994. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01994>. Aug 29.
- Zurfluh, K., Jakobi, G., Stephan, R., Hächler, H., Nüesch-Inderbinen, M., 2014. Replicon typing of plasmids carrying 1 bla_{CTX-M-1} in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. *Front. Microbiol.* 5, 555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00555>. Oct 30.



OPEN ACCESS

EDITED BY
F-X Campbell-Valois,
University of Ottawa, CanadaREVIEWED BY
David W. Ussery,
University of Arkansas for Medical Sciences,
United States
Frederic Auvray,
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
(ENVT), France*CORRESPONDENCE
Rosa del Carmen Rocha-Gracia
✉ rochagra@yahoo.com;
✉ rosa.rocha@correo.buap.mxRECEIVED 09 June 2023
ACCEPTED 15 September 2023
PUBLISHED 09 October 2023CITATION
Balbuena-Alonso MG, Camps M,
Cortés-Cortés G, Carreón-León EA,
Lozano-Zarain P and Rocha-Gracia RdC
(2023) Strain belonging to an emerging,
virulent sublineage of ST131 *Escherichia coli*
isolated in fresh spinach, suggesting
that ST131 may be transmissible through
agricultural products.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 13:1237725.
doi: 10.3389/fcimb.2023.1237725COPYRIGHT
© 2023 Balbuena-Alonso, Camps, Cortés-
Cortés, Carreón-León, Lozano-Zarain and
Rocha-Gracia. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Strain belonging to an emerging, virulent sublineage of ST131 *Escherichia coli* isolated in fresh spinach, suggesting that ST131 may be transmissible through agricultural products

Maria G. Balbuena-Alonso¹, Manel Camps²,
Gerardo Cortés-Cortés^{1,2}, Eder A. Carreón-León³,
Patricia Lozano-Zarain¹ and Rosa del Carmen Rocha-Gracia^{1*}¹Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias,
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ²Department of Microbiology and
Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA, United States,
³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Mexico

Food contamination with pathogenic *Escherichia coli* can cause severe disease. Here, we report the isolation of a multidrug resistant strain (A23EC) from fresh spinach. A23EC belongs to subclade C2 of ST131, a virulent clone of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC). Most A23EC virulence factors are concentrated in three pathogenicity islands. These include PapGII, a fimbrial tip adhesin linked to increased virulence, and *CsgA* and *CsgB*, two adhesins known to facilitate spinach leaf colonization. A23EC also bears TnMB1860, a chromosomally-integrated transposon with the demonstrated potential to facilitate the evolution of carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing enterobacteriales. This transposon consists of two IS26-bound modular translocatable units (TUs). The first TU carries *aac(6)-lb-cr*, *bla_{OXA-1}*, *ΔcatB3*, *aac(3)-lle*, and *tmrB*, and the second one harbors *bla_{CXT-M-15}*. A23EC also bears a self-transmissible plasmid that can mediate conjugation at 20°C and that has a mosaic IncF [F(31,36):A(4,20):B1] and Col156 origin of replication. Comparing A23EC to 86 additional complete ST131 sequences, A23EC forms a monophyletic cluster with 17 other strains that share the following four genomic traits: (1) virotype E (*papGII+*); (2) presence of a PAI II₅₃₆-like pathogenicity island with an additional *cnf1* gene; (3) presence of chromosomal TnMB1860; and (4) frequent presence of an F(31,36):A(4,20):B1 plasmid. Sequences belonging to this cluster (which we named "C2b sublineage") are highly enriched in septicemia samples and their associated genetic markers align with recent reports of an emerging, virulent sublineage of the C2 subclade, suggesting significant pathogenic potential. This is the first report of a ST131 strain belonging to subclade C2 contaminating green leafy vegetables. The detection of this

uropathogenic clone in fresh food is alarming. This work suggests that ST131 continues to evolve, gaining selective advantages and new routes of transmission. This highlights the pressing need for rigorous epidemiological surveillance of ExPEC in vegetables with One Health perspective.

KEYWORDS

ExPEC, ST131, food safety, virulence, mobile genetic elements, conjugative transfer

1 Introduction

Food products are a key source for transmission of pathogenic bacteria, such as *Salmonella* and *Escherichia coli*. (Gizaw, 2019) *E. coli* colonizes the human gastrointestinal tract as a commensal but some pathotypes of *E. coli* can cause serious disease (Denamur et al., 2021). Pathogenic strains of *E. coli* can be grouped into intestinal (InPEC) and extraintestinal (ExPEC) pathotypes depending on whether they cause primarily gastrointestinal symptoms or whether they affect other organs, including urinary tract, bloodstream, wounds, kidney, brain, and other internal organs (Sora et al., 2021). ExPEC strains are responsible for a large fraction of urinary tract and bloodstream infections in humans (Sarowska et al., 2019) and can be classified into 4 pathotypes: uropathogenic *E. coli* (UPEC, primarily associated with urinary tract infections-UTIs), avian pathogenic *E. coli* (APEC, which causes colibacillosis in poultry but that can also infect humans), septicemia-associated *E. coli* (SEPEC) and neonatal meningitis-causing *E. coli* (NMEC) (Meena et al., 2023).

Community and hospital ExPEC infections are generally treated with 2nd and 3rd generation cephalosporins, fluoroquinolones, or with trimethoprim-sulfamethoxazole (Pitout, 2012). Resistance to cephalosporins can generally be attributed to the acquisition of genes with extended-spectrum β -lactamase (ESBL) activity; in ExPEC, the most frequent ones are *bla*_{CTX-M} variants. Resistance to fluoroquinolones is largely due to mutations that reduce the affinity of these drugs for their targets (gyrase -*gyrAB*- and topoisomerase IV -*parCE*-), although resistance can also be provided or enhanced by a fluoroquinolone-degrading enzyme (*aac(6)-Ib-cr*), by DNA-protecting enzymes (*qnr* genes), or by efflux regulation mutations (*marR*, *acrR* and *soxR*) (Huseby et al., 2017; Poirel et al., 2018). Resistance to dihydrofolate metabolism inhibitors is generally provided by dihydrofolate synthetase genes

that are insensitive to sulfonamides (*sul*) or by dihydrofolate reductase mutants (*dhfr*) that are insensitive to trimethoprim (Van Duijkeren et al., 2000). Topoisomerase genes represent core functions and are most frequently found in the chromosome. The other resistance genes are accessory and tend to be found in plasmids, which in turn facilitate their spread, mostly by conjugation. Over time, plasmid-borne genes tend to get incorporated into chromosomes with the assistance of mobile genetic elements (MGEs) such as insertion sequences and transposons (Wang Y. et al., 2022).

Sequence type 131 (ST131) is a globally-dominant multidrug resistance (MDR) clone and a major driver of the current ExPEC pandemic. Compared to other globally dispersed clones, ST131 stands out for its highly dynamic accessory genome (Decano et al., 2021). Like most UPEC strains, ST131 resides in the human gut as a commensal but can cause mild to severe infections of urinary tract and asymptomatic urinary bacteriuria (Biggel et al., 2020; Tchesnokova et al., 2020). The ST131's genome exhibits a broad range of known or suspected virulence factors that likely contributed to its dominance in the clinic. These include siderophores, adhesins, toxins, protectins and other elements contributing to the successful establishment and persistence of an infection. Some of these factors are specific to ST131 sublineages, notably *hly* (hemolysin), *iro* (siderophore), AAF (aggregative adherence fimbriae), and *papGII* (P fimbrial tip adhesin variant).

The complex population structure of ST131 has been elucidated (Price et al., 2013; Petty et al., 2014). Two ancestral clades have been identified, namely clade A (which carries the *fimH41* allele) and clade B (which carries the *fimH22* and *fimH35* allelic variants). Strains belonging to these two clades, which are now infrequent, are generally sensitive to fluoroquinolones and rarely carry ESBL plasmids, although they occasionally have *bla*_{CTX-M} genes integrated in the chromosome. Clade C is an emerging epidemic lineage characterized by multidrug resistance and higher virulence (Denamur et al., 2021). This clade appears to have evolved from clade B by the acquisition of the *fimH30* allele and of several prophages and it expresses serotype O25b:H4. Within clade C, three subclades can be distinguished by divergent antimicrobial resistance profiles: C0, which is sensitive to fluoroquinolones, and C1 and C2, which have acquired fluoroquinolone resistance mutations in *gyrA* and *parC*. C1 and C2 in turn, differ in the *bla*_{CTX-M} gene associated with them: subset C1 (with *fimH30R1*), is typically associated with *bla*_{CTX-M-14} or with *bla*_{CTX-M-27}, whereas

Abbreviations: MDR, multidrug resistance; ExPEC, Extraintestinal pathogenic *E. coli*; PTU, Plasmid Taxonomic Unit; MLST, Multilocus Sequence Typing; STs, Sequence Types; TA, Toxin-Antitoxin systems; MGEs, Mobile Genetic Elements; ESBL, Extended-Spectrum β -lactamases; CRE, Carbapenem-resistant Enterobacteriales; ARG, Antibiotic Resistance Gene; TU, Translocatable Unit; MDR, MultiDrug Resistance; RDR, Resistance Determining Region; UPEC, UroPathogenic *Escherichia coli*; APEC, Avian Pathogenic *Escherichia coli*; PAI, Pathogenicity Island; UTI, Urinary Tract Infection; CAT, Chloramphenicol Acetyl Transferase; IS, Insertion Sequence; PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis.

subset C2 (with *fimH30RX*), is generally associated with *bla*_{CTX-M-15}. The *bla*_{CTX-M-15} gene was initially carried by IncF plasmids but more recently the mobilization of this gene to the chromosome has been reported through transposition events frequently involving insertion sequences belonging to the IS26 family (Dhanji et al., 2011; Stoesser et al., 2016). The C2 subclade has been found to be enriched in highly virulent and multidrug resistance isolates, with the virulence associated with the presence of the gene *papGII* (Pajand et al., 2021; Biggel et al., 2022).

ST131's main reservoir is thought to be the human intestine and the usual route of transmission to be person-to-person contact (Lopez et al., 2014; Pitout and Finn, 2020); however, an increasing (although still small) number of studies are reporting its isolation from non-human sources, such as food, food animals, pets, and environmental sources, suggesting that these may represent vectors for the transmission of this strain (Meena et al., 2023). ST131 strains recovered from food have been associated primarily with meat products, particularly pork and chicken (Meena et al., 2021); because of ST131's ability for long-time residence in the gastrointestinal tract, animal carcasses contaminated with intestinal content are considered the likely source in meat products. It also needs to be noted that, in addition to contaminating food, *E. coli* food strains can also function as reservoirs of virulence and antibiotic resistance genes, which can be frequently exchanged with clinical strains via horizontal gene transfer (HGT) (Balbuena-Alonso et al., 2022).

Here we report the isolation, phenotypic characterization, and genomic sequence of an *E. coli* isolate from a spinach sample that we named A23EC. We describe the presence of a large number of virulence factors, mainly located in three pathogenicity islands, that suggest a uropathogenic pathotype. Also, we show that this strain presents a multidrug resistance profile that is consistent with its antibiotic resistance gene (ARG) content, and we describe a conjugative plasmid that is capable of self-transmission even at room temperature. Finally, we compare A23EC's genomic sequence with that of other fully-assembled ST131 genomes in *GenBank* and find that A23EC belongs to a virulent, emerging sublineage of the ST131 subclade C2. We identify genetic markers unique to this sublineage and report on their alignment with earlier studies of virulent sublineages of the C2 subclade that were based on partially assembled sequences. These results highlight the pressing need for rigorous epidemiological surveillance of ExPEC in vegetables with a One Health perspective.

2 Materials and methods

2.1 Produce fresh sampling and bacterial isolation

During the period from April 2017 to November 2018, ready-to-eat raw vegetables were collected from fixed and mobile food service establishments, in Puebla, Mexico (19.03 N, -98.20 W). A total of 183 samples were obtained from 82 establishments with lettuce (21%), tomato (17%), onion with coriander (13%), cucumber (12%), onion (9%), carrot (6%), radish (6%), coriander

(5%), brussels sprouts (3%), red onion (3%), celery (1%), spinach (1%), a mix of tomato, onion and coriander (1%), squash (1%), and green bell pepper (1%). All samples were stored at 4°C and processed within 24 h. For bacterial isolation, 10g of food were inoculated in 20 mL of sodium lauryl sulfate broth (BD Bioxon®) and incubated at 37°C with shaking at 30 rpm for 24 h. Subsequently, the cultures were streaked onto MacConkey agar plates (BD Bioxon) supplemented with cefotaxime (CTX) (2ug/ml). Colonies were picked from the selective plates, subcultured and streaked to obtain pure cultures. Putative strains were identified according to biochemical tests with Vitek system (bioMérieux, France) following the schemes in MacFaddin's Manual of Biochemical Tests for the Identification of Clinically Important Bacteria (MacFaddin, 2003). Also, *E. coli*-specific *ybbW* and *uidA* genes were used to confirm their identity by PCR (Silkie et al., 2008; Walker et al., 2017).

2.2 Antimicrobial susceptibility testing and detection of resistance genes

The antibiotic susceptibility profile was obtained by agar dilution methods using criteria from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines as a reference (CLSI, 2022); as a control, the strain *E. coli* ATCC 25922 was used. Twenty-one antimicrobial agents belonging to 12 antibiotic classes were tested: amikacin (30 ug), gentamicin (10 ug), streptomycin (10 ug), tobramycin (10 ug), ampicillin (10 ug), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 ug), cefuroxime (30 ug), cefotaxime (30 ug), ceftazidime (30 ug), cefepime (30 ug), ceftoxitin (30 ug), aztreonam (30 ug), trimethoprim (5 ug), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 ug), nalidixic acid (30 ug), ciprofloxacin (5 ug), chloramphenicol (30 ug), tetracycline (30 ug), meropenem (10 ug), imipenem (10 ug) and fosfomycin/G6P (200/50 ug) (BBLTM Sensi-DiscTM; Becton Dickinson and Co). Cefotaxime resistant (CTX-resistant) *E. coli* isolates were screened for ESBL production by the double-disk synergy test using disks containing cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and cefepime, with a centrally positioned disk of amoxicillin/clavulanic acid (20/10 ug).

2.3 DNA isolation and whole-genome sequencing analysis

The ESBL-producing *E. coli* strain isolated from spinach was selected for whole-genome sequencing (WGS). This strain (A23EC) was cultured overnight at 37°C in brain heart infusion broth; total DNA extraction was performed using the Wizard® genomic DNA purification kit (Promega, United States) according to the manufacturer's instruction. Sequencing was performed using two platforms: short reads were generated on the Illumina Nextseq 500 platform using 75-bp paired-end (Illumina, United States) and long reads were generated on the Nanopore Minion platform depth 80x (Nanopore, United States). Quality check of the raw sequencing data was performed using Quast v0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Wingett

and Andrews, 2018). In the next step, hybrid genome assembly was generated with SPAdes v3.9.0 and Unicycler v0.5.0 assemblers (Bankevich et al., 2012; Wick et al., 2017). Finally, annotation was performed by the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi> (accessed on June 17, 2022) (Aziz et al., 2008) and using PROKKA v1.2 (Seemann, 2014). Sequence type was characterized using MLST v2.0 (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp> (accessed on June 25, 2022), and pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>) (Villa et al., 2010); the serotypes (O:H) were predicted with SerotypeFinder v2.0 (Joensen et al., 2015) whereas phylogroup was determined using the ClermontTyping 1.4 (Clermont et al., 2013) (<http://clermonttyping.iame-research.center>), and finally the variant of the *fimH* gene was determined using FimTyper v1.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/FimTyper>) (Roer et al., 2017).

2.4 Plasmid analysis

PFGE with S1 nuclease (S1 Nuclease Thermo Scientific) digestion of whole genomic DNA was used for determine the number and size of plasmids of strain A23EC (Ben Sallem et al., 2014). PlasmidFinder 2.1 (Carattoli et al., 2014) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (85% identity and 70% minimum length) was used to identify the replicon present for each plasmid and the replicase type. The presence of conjugation elements in plasmids was performed by using the tool OriTfinder 1.1 (Li et al., 2018) (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/oriTfinder/>) with modified parameters (Blast E-value 0.00001) and the identity of relaxase was confirmed with MOBScan (Garcillán-Barcia et al., 2020) (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan>). Also, Plasmid Taxonomic Units (PTU) were identified by COPLA (a taxonomic classifier of plasmids) using the recommended parameters (Redondo-Salvo et al., 2020) (<https://castillo.dicom.unican.es/copla/>). The search for type I (*pndAD*, *srmBC* and *hok-sok*) and type II (*ccdAB*, *relEB*, *parDE*, *pemKI* and *vagCD*) addiction systems was performed by BLASTn alignment with the parameters 90% coverage, 80% identity and E-value \leq 0.000001; the system was considered to be present if the Antitoxin-Toxin (AT) sequences were adjacent. Finally, Blast Ring Image Generator (BRIG) v0.95 was used with default settings to compare our plasmid sequences to publicly available sequence (Alikhan et al., 2011) and visualized using Proksee.ca 1.0 (Stothard et al., 2018).

2.5 Detection of virulence and resistance genes

Antimicrobial resistance genes were detected using ResFinder v4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (Bortolaia et al., 2020) (with parameters 80% of coverage and 90% of identity) and the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v3.2.5 (<https://card.mcmaster.ca/analyze>) (McArthur et al., 2013) by the Resistance Gene Identifier (RGI) with the “strict” algorithm. The virulence gene profile of the isolate was established based on the detection of these genes in VirulenceFinder v2.0 (the cut-off values

for genes identity was 90% and alignment coverage was 70%) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) (Tetzschner et al., 2020), Virulence Factor database (VFDB) and VFAnalyzer with default parameters (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>, accessed on October 20, 2022) (Liu et al., 2019). The virotype was assigned according to the presence of virulence genes following the scheme described by Nicholas-Chanoine et al, and the additional ones suggested by Barrios-Villa et al. (Nicolas-Chanoine et al., 2014; Barrios-Villa et al., 2018). The Pathogenicity Islands were predicted using IslandViewer 4, which uses three independent methods for island prediction: IslandPick, IslandPath-DIMOB and SIGI-HMM (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) (Bertelli et al., 2017), sequence comparison of each island was performed using Blastn v2.13 and Easyfig v2.2.5 (Sullivan et al., 2011) using the sequences of the prototype strains reported by Desvaux et al., 2020. Finally, PHASTER web server was used to predict prophage regions in the genome of A23EC strain (<https://phaster.ca/>) (Arndt et al., 2016). Insertion sequences and transposons were identified with Mobile Element Finder v1.0.3 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) (Johansson et al., 2021) and the identity of the insertion sequences was confirmed using ISfinder (Siguier et al., 2006); while VRprofile2 (<https://tool2-mml.sjtu.edu.cn/VRprofile/>) (Wang M. et al., 2022) was used to identify the genetic environment of the resistance genes. CD-HIT-EST (Li and Godzik, 2006) was used to cluster similar structures with more than 99% coverage and similarity, and a multiple genetic structural comparison was represented using Easyfig v2.2.5 (Sullivan et al., 2011).

2.6 Phylogenetic analysis

We compared the *E. coli* strain A23EC with other 86 fully assembled *E. coli* ST131 genomes deposited in GenBank, belonging to clades A, B and C. The metadata collected was the source of isolation, year of sampling, and country of origin (Table S1). All the *E. coli* genomes referred to as “Clinical” (66 strains) were associated with human infections recovered from urine, blood, sputum, and feces. The category “Animal” (4 strains) represented samples of dog, cat, and pig. The category “Environmental” (3 strains) includes strains isolated from wastewater bodies. Thirteen strains were not classified according to their sample type, and they were marked as “No data available”. The unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) was performed based on SNPs, using the newick graph obtained with CSI Phylogeny (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny-1.2/>, accessed on June 27, 2022) (Kaas et al., 2014) with EC598 as reference genome (accession number NZ_HG941718.1) (Forde et al., 2014). The SNP tree was visualized using iTOL software (<https://itol.embl.de>) (Letunic and Bork, 2021).

2.7 Conjugation assays

The two strains : donor (A23EC^{Tet^r}) and recipient (C600^{Rif^r}): donor (A23EC^{Tet^r}) and recipient (C600^{Rif^r}) were cultured

separately in 5 mL Luria Bertani broth (LB) and incubated at 37°C overnight. Subsequently, 1000 µL of the recipient and 250 µL of the donor were mixed and inoculated into 20 mL of LB, incubated for 24 hours at 37°C and 20°C with shaking at 130 rpm. Finally, serial dilutions from 100 to 10⁻⁶ or 1,000,000 were performed and plated for selection of transconjugants (Cortés-Cortés et al., 2016). Transconjugants were selected using MacConkey agar (BD Bioxon) supplemented with rifampicin (100 µg/mL) and tetracycline (10 µg/mL). To confirm the identity of the transconjugants, PCR amplifications of the *tetA* (plasmid location) and *bla_{CTX-M-15}* (chromosomal location) genes were performed. Only *tetA* was expected to be amplified in the transconjugants. Each experiment was performed in triplicate. The plasmid transference under the two temperatures was compared by *t*-student in Rstudio statistical software 1.4.1103. The frequency of conjugation (Fc) is described in this study as the ratio of the number of transconjugants divided by the number of recipients (Huisman et al., 2022; Mota-Bravo et al., 2023), expressed by the following equation:

$$FC = \frac{\text{Transconjugants} / \left(\frac{CFU}{mL} \right)}{\text{Recipient} / \left(\frac{CFU}{mL} \right)}$$

2.8 Accession numbers

GenBank accession numbers of the strain A23EC genome sequenced for this study are Chromosome CP118558.1 and plasmid pA23EC CP118559.1 Bioproject: PRJNA936840. BioSample: SAMN33377322.

3 Results

3.1 Isolation of an ExPEC strain from spinach

As part of a study involving 183 vegetable samples, in 2017–2018 we isolated a CTX-resistant strain from a spinach sample obtained in a supermarket in the city of Puebla, Mexico. The spinach sample came from a bulk-salad section that was not contained in sealed packaging. The sample was collected into an individual sterile bag, stored at 4°C and transported immediately to the laboratory for processing. Biochemical tests identified the isolate as being *E. coli* and this identity was confirmed using conventional PCR amplification of two diagnostic markers for *E. coli* (*ybbW* and *uidA*, not shown).

Next, we obtained the complete genomic sequence of this strain, which we named A23EC, using the Illumina Nextseq 500 and Nanopore Minion platforms, generating a hybrid assembly using short and long sequences, respectively. According to its sequence, A23EC belongs to phylogroup B2, sequence type ST131 and serotype O25:H4. The presence of allelic variant *fimH30Rx* identifies this strain as belonging to clade C, subclade C2, a lineage that includes highly virulent clones (Stoesser et al., 2016; Pajand et al., 2021; Biggel et al., 2022). The closest relative to A23EC

in *GenBank* is the p4A strain (CP049085.2), isolated from a patient suffering from bacteremia in the United States in 2015 (Table S2) and reported in Shropshire et al., 2021. The genome features, virulome and resistome of *E. coli* A23EC strain are summarized in Table 1.

To see how A23EC relates to other ST131 strains, we performed a phylogenetic analysis of A23EC along with all other complete ST131 genomes of *E. coli* deposited in *GenBank* until June 2022. The results, shown in the form of a cladogram are presented in Figure 1. The 86 ST131 genomes included in this analysis group into the three known ST131 clades, namely A, B, and C. Within the C clade, they group into two main subclades (C1 and C2). Within the C2 subclade, we see two distinct monophyletic clusters (sublineages), that we named C2a (13 strains) and C2b (18 strains). A23EC belongs to sublineage C2b. Figure 1 also lists the source of the samples (when known). Genomes corresponding to sublineage C2b largely correspond to human clinical strains, with three environmental strains isolated from wastewater. The geographic origin of sublineage C2b samples is listed in Table S1, and includes samples from Europe, Asia, Australia and North and South America.

3.2 Pathogenicity molecular profile

Using IslandViewer 4, we identified three pathogenicity islands, mapped to the chromosome in Figure 2. The first one was PAI I A23EC (this PAI is similar to PAI II₅₃₆), which contained the genes *hlyABCD* (hemolysin encoding cluster), *fimC* (chaperone-like periplasmic protein) and *papABCDEHKX* and *papGII* (P-fimbrial tip adhesin). Unlike PAI II₅₃₆, PAI I_{A23EC} also carries *cnfI* (cytotoxic necrotizing factor). The second pathogenicity island is PAI II A23EC (which is similar to PAI I_{CF1073}), which harbored the *iucABCD* genes, members of a family of non-ribosomal peptide synthetase-independent siderophore (NIS), *sat* (secreted autotransporter toxin), *kpsMII-K5* (capsular protein variant K5), *iha* (iron-regulated gene homologue adhesin), and *iutA* (ferric aerobactin receptor). Finally, the third pathogenicity island is PAI III A23EC. This PAI is similar to PAI II_{CF1073} corresponding to high pathogenicity island (HPI) (Schubert et al., 2004; Llyod et al., 2009) including the siderophore yersiniabactin biosynthesis and uptake genes *irp1*, *irp2*, *fyuA* and *ybtAEPQSTX* (Perry et al., 1999).

Virulencefinder identified twenty-four additional virulence genes in the genome of A23EC. These genes can be grouped into the following five functional categories: 1) bacterial adhesion (*csgAB*, *yfcV* and operon *fimABCDFGHI*); 2) iron acquisition (*sitA*, *chuA*, *iucD* and *iutA*); 3) serum resistance (*iss*, and *traT*); 4) colonization and invasion (*ompT*, *yehABCD* and *malX*); and 5) toxin genes (*usp* and *senB*) (Figures 2, S1).

3.3 Phenotypic and genotypic antibiotic resistance profile

A23EC's antibiotic resistance profile and ESBL status was determined using the Kirby-Bauer method. Phenotypically,

TABLE 1 Genome features, virulome and resistome of *E. coli* A23EC strain.

Feature	Chromosome	Plasmid pA23EC
Size (bp)	5,239,797	157,470
GC (%)	50.6	50.3
No. of genes	5253	217
Inc group (pMLST)	NA	FII : FIA:FIB : Col156
Virulome		
Virulence genes	<i>csgAB, iss, sitA, malX, yehABCD, yfcV, chuA, fimABCD, usp, ompT</i>	<i>senB, iutA, traT, iucD</i>
Pathogenicity island (PAI)	CFT073 (I, II), 536 (II)	
Resistome		
Aminoglycosides	<i>aac(3)-Ile, aac(6')-Ib-cr</i>	
Betalactams	<i>bla_{CTX-M-15}, bla_{OXA-1}</i>	
Quinolones	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	
QRDR quinolones	<i>gyrA</i> (S83L, D87N), <i>parC</i> (S80L)	
Macrolides	<i>mdfA</i>	
Phenicol	Δ <i>catB3</i>	
Tetracyclines		<i>tetAR</i>
Metals	<i>baeRS, cpxA, pmrF</i>	
Biocides	<i>acrABDFS, evgAS, mdtBCEFGH, sitA, marA, emrABEKRY, tolC, gadWX</i>	
Heat stress tolerance	<i>KpnEF</i>	

NA, not applicable; QRDR, quinolone resistance-determining region.

A23EC is a MDR strain (Magiorakos et al., 2012), exhibiting resistance to at least one member of six different antibiotic families: aminoglycosides, penicillin, cephalosporins, tetracyclines, quinolones and monobactams. In addition, our A23EC strain showed a positive ESBL phenotype and intermediate resistance profile for amikacin and amoxicillin with clavulanic acid. The only antibiotics tested that this strain remained susceptible to were carbapenems, fosfomicin, chloramphenicol and trimethoprim with sulfamethoxazole (Table S3).

Using Resfinder and RGI CARD, we found the following ARGs (Table 1): two genes encoding β -lactamase (*bla_{CTX-M-15}* and *bla_{OXA-1}*), one aminoglycoside resistance gene (*aac(3)-Ile*) and an aminoglycoside and quinolone resistance gene (*aac(6')-Ib-cr*), an efflux pump (*mdfA*), a truncated chloramphenicol resistance gene (Δ *catB3*), a tunicamycin resistance determinant (*tmrB*) (Noda et al., 1992), and the gene *tetA* associated with resistance to tetracycline (alongside *tetR*, transcriptional repressor). The truncated Δ *catB3* gene harbors two in-frame deletions involving a total of 28 amino-acids (see nucleotide alignment in Figure S3). These two deletions reduce the size of this 210 amino-acid protein to 182 amino acids, and result in a loss of homology with respect to the WT beginning at amino acid position 147 (see amino acid alignment in Figure S3B), thus deleting the entire C-terminal α -helical domain.

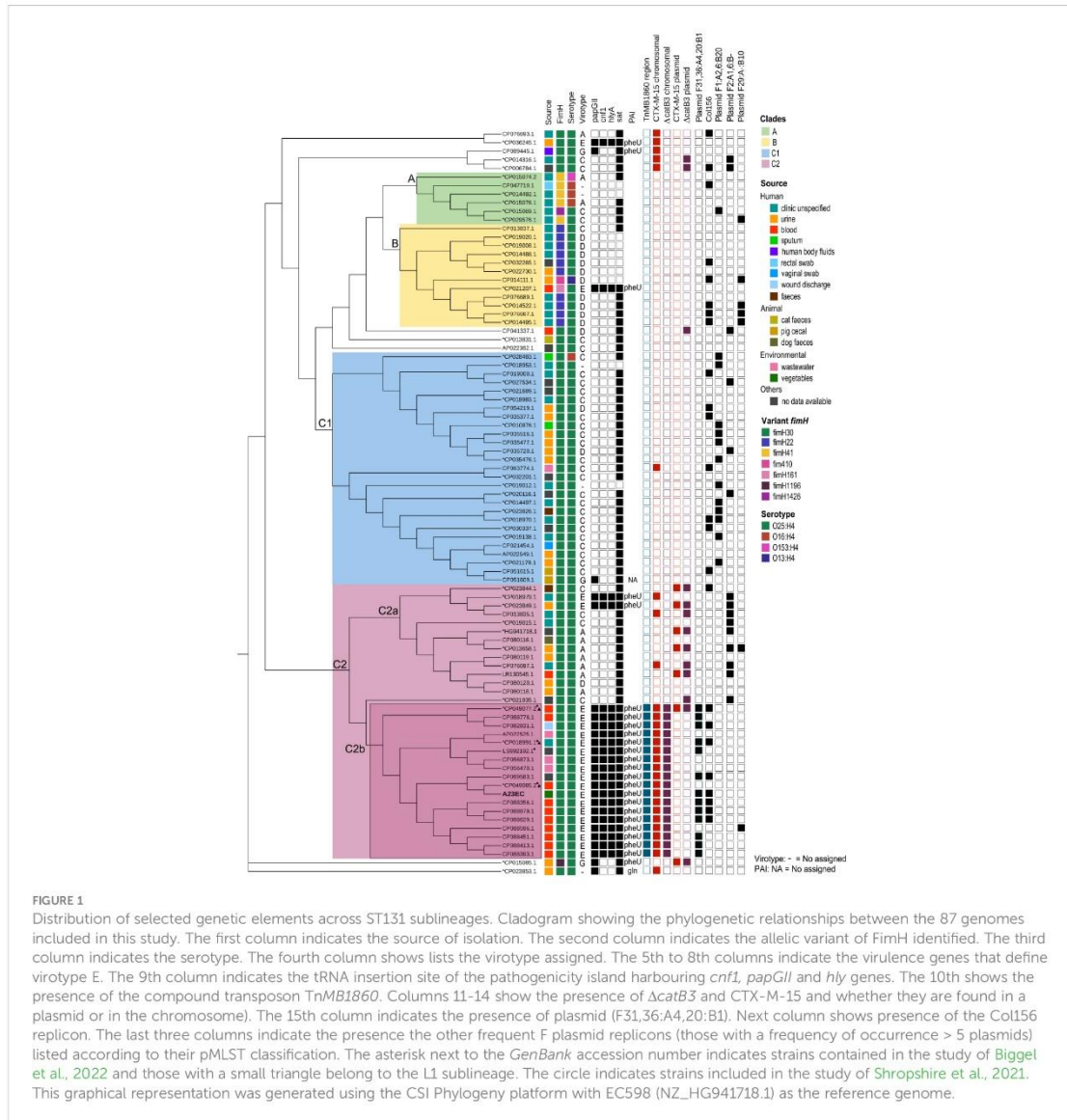
The *gyrA* subunit of gyrase and the *parC* subunit of topoisomerase IV had three point mutations conferring fluoroquinolone resistance: S83I, D87N in gyrase and S80L in topoisomerase IV. The presence of *bla_{CTX-M-15}* and of

fluoroquinolone resistance mutations in *gyrA* and *parC* are consistent with the placement of this strain in subclade C2 of ST131.

3.4 Genomic structure of chromosomal ARGs

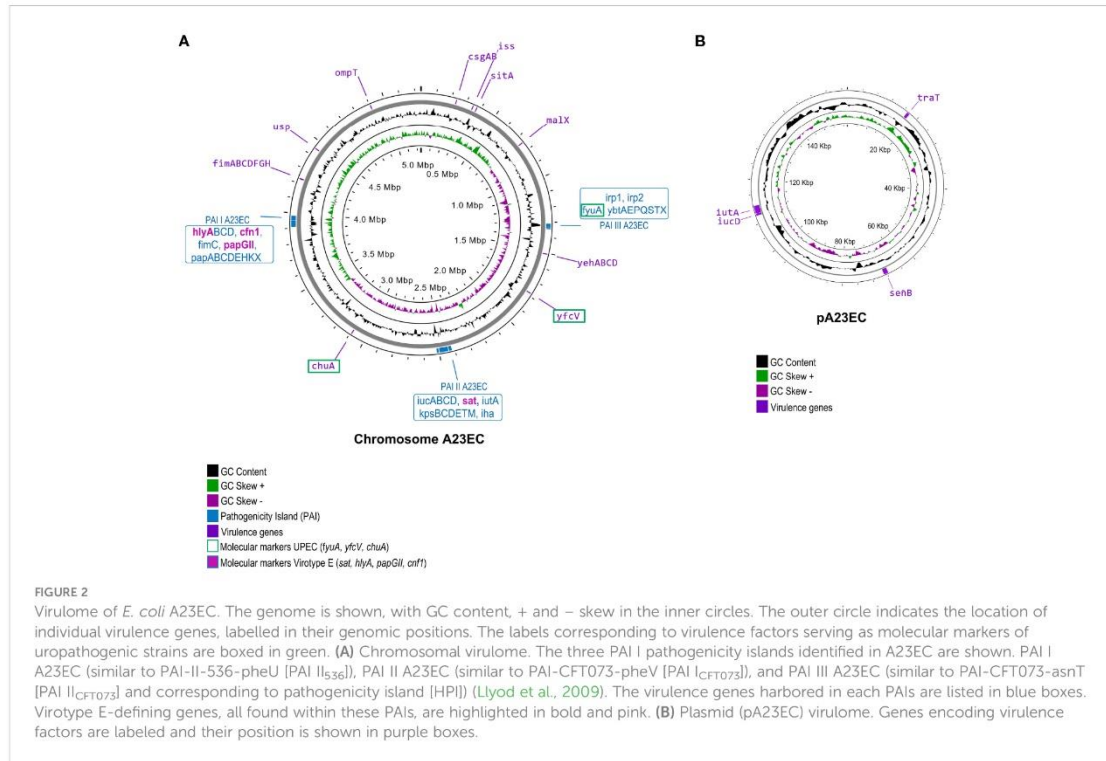
Looking at the distribution of ARG genes in the chromosome, we found TnMB1860, a 12,837 bp- IS26-bounded transposon structure integrated in the chromosome, previously described by Shropshire et al., 2021. TnMB1860 is made up of two discrete, modular translocatable units (TUs): MB1860TU_A and MB1860TU_B (Figure 3A). MB1860TU_A carries the *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}* and truncated Δ *catB3* genes flanked by two IS26 elements in opposite orientations, followed by two additional antibiotic resistance genes (*aac(3)-Ile* and *tmrB*) and is bordered on the 3' end by a Δ IS3, ISKpn11, IS26 and Δ Tn2 cluster. MB1860TU_B is bounded by two IS26 elements in the sense orientation and it has a partial ISEcp sequence, a *bla_{CTX-M-15}* gene and the *wbuC* gene (also known as *orf477*) in the opposite orientation; its genetic organization is common for *bla_{CTX-M-15}* (Dhanji et al., 2011; Ludden et al., 2020).

Chromosomal TnMB1860 was previously reported in two non-carbapenemase producing septicemia isolates by Shropshire et al., 2021 (Shropshire et al., 2021), that (like A23EC) belonged to subclade C2 of ST131. To establish the distribution of TnMB1860 (flanked by IS26) more widely, we looked for the presence of the



complete sequence in 2,387 complete genomes of *E. coli*. As a threshold, we selected 98% sequence identity with a coverage >70%, then further confirmed that it was a similar arrangement by detecting the presence of the six relevant resistance genes within a 20,000 bp window. Based on these criteria, we found 18 highly significant hits, all of them chromosomal except for one (Table S2). Remarkably, all the 17 chromosomal sequences belong to the C2b sublineage of subclade C2 identified by our phylogenetic analysis shown in Figure 1. This observation suggests that *TnMB1860* was captured during the evolution of the C2 subclade C2b and passed down vertically, making it a good identifier for sublineage C2b (Figure 1). In sixteen of these sequences (including that of strain

A23EC) the insertion site of *TnMB1860* is found ~4,400 bp away from the gene encoding methionyl-tRNA synthetase, *metG*, in a molybdopterin cofactor biosynthesis operon. In only one strain (p4A; sequence CP049085.1) *TnMB186* was located adjacent to the gene encoding colicin I receptor, disrupting it ($\Delta cirA$) (Figure 3C). The consistency between insertion sites and the observed clustering of this transposon's representation in the cladogram (which points to vertical transmission) suggests that this is likely the result of a single capture event. The one exception in strain p4A presumably appears to be the result of an additional IS26-mediated intramolecular transposition event so it is still consistent with the hypothesis of a single capture event (Shropshire et al., 2021).



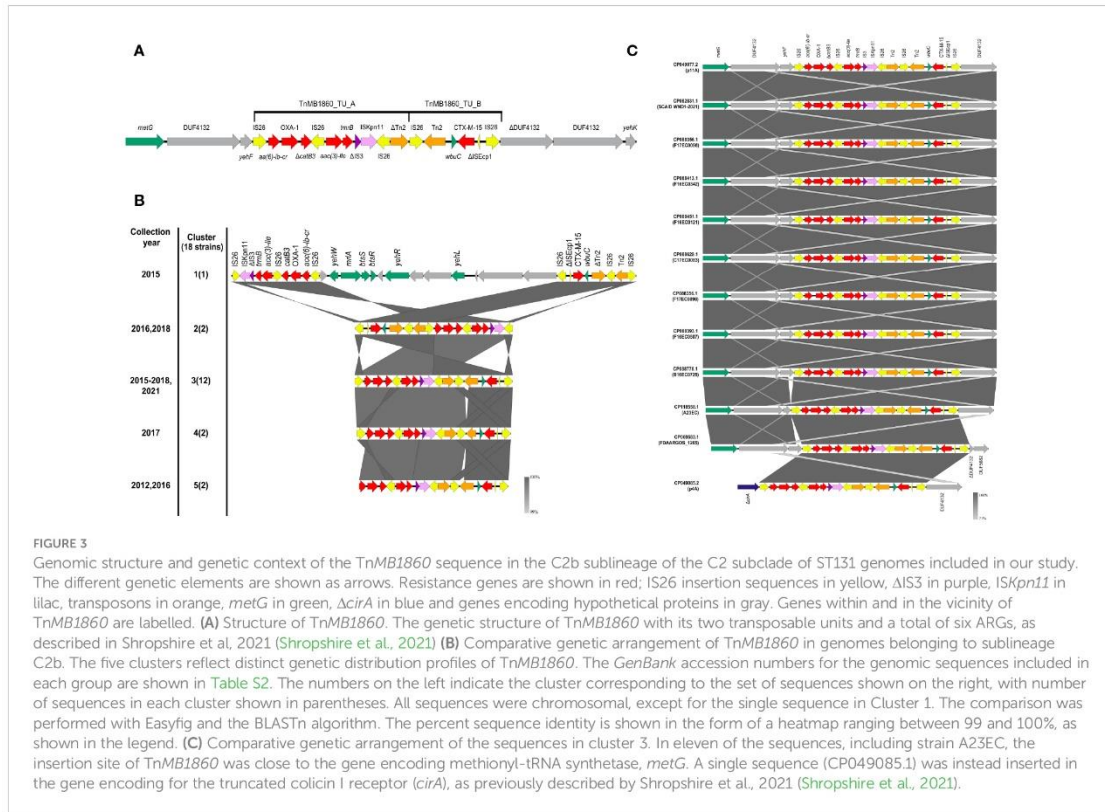
We also found a single *TnMB1860* sequence located in a plasmid. This plasmid was p11A_p2, a 180,962 bp plasmid described by Shropshire et al., 2021. Plasmid p11A_p2 includes the MB1860TU_A and MB1860TU_B TUs located downstream of the class 1 integron carrying *dfrA17*, *aadA5*, *qacEΔ1* and *sul1*. The two *TnMB1860* TUs are not contiguous, though, but separated by a large insertion sequence (18,314 bp in length) containing 9 ORFs that include several virulence factors (Figure 3B). Plasmid p11A_p2 was found in strain 11A (CP049077.2), which also contained *TnMB1860* integrated in the chromosome (Shropshire et al., 2021).

A comparative analysis of the structure of the *TnMB1860* region in the sequences included in the C2b sublineage resulted in five distinct clusters (clusters #1 to 5). The canonical gene arrangements for each cluster are shown in Figures 3B, C and S4. The majority of genomic sequences (n=12) belong to cluster 3; all strains in this cluster show an identical structural profile of *TnMB1860* (delimited by IS26); as mentioned above, strain p4A (CP049085.2) differs from the remaining eleven, including strain A23EC, in its insertion site (*ΔcirA*), but it shows an otherwise identical structure (Figure 3C). Cluster 1 contains the single plasmid *TnMB1860* sequence (described above). Cluster 2, with two sequences, has MB1860TU_B translocated just upstream of MB1860TU_A in an inverted orientation, as well as an inversion of the IS26 elements flanking the composite transposon (Figure 3B). Cluster 4, with two sequences, exhibits a loss of Tn2 (Figure 3C). Finally, cluster 5, also with two sequences, exhibits a loss of IS26 flanking the 5' end of the MB1860TU_A region, as well as a Tn2 element (Figure 3B).

3.5 Identification and characterization of plasmid content

Whole genome sequencing identified a single plasmid in the A23EC genome, which we named pA23EC. The presence of this plasmid was confirmed using the S1-PFGE technique (Cortés-Cortés et al., 2016). This plasmid is 157,470 bp in size, has a GC content of 50.3% and contains 172 putative coding regions (CDS) according to Prokka and RAST. Of these, only two CDSs (*tetA* and *tetR*) corresponded to ARGs, both part of a tetracycline resistance operon. These two genes were located contiguously and flanked by *TnAs1*. VirulenceFinder and VFAnalyzer identified four virulence genes in pA23EC, namely *iutA*, *iucD* (related to iron uptake), *traT* (associated with serum resistance) and *senB* (encoding enterotoxin) (Figure 2).

In terms of plasmid regulatory elements, PlasmidFinder identified four replicons, namely Col156, IncFII, IncFIA, and IncFIB. The three IncF replicons are widely separated from each other in the plasmid sequence and their alleles correspond to the F (31,36):A(4,20):B1 subclassification proposed by Villa et al. (Villa et al., 2010). The Col156 replicon is separated from the closest IncF replicon by 30,748 bp. COPLA, which is the most accurate method available for plasmid classification according to phylogenetic relatedness (Redondo-Salvo et al., 2021), ascribed pA23EC to the FE plasmid taxonomic unit (PTU-FE). We also found an abundance of plasmid maintenance systems, these including three type II toxin-antitoxin systems (*ccdAB*, *vapBC* and *pemKI*) and the



parAB genes coding for a partitioning system that ensures accurate plasmid segregation (Figure 4, outer circle).

We looked for the presence of additional F(31,36):A(4,20):B1 plasmids in the 86 genomes shown in Figure 1 and found eleven other examples, all within the C2 subclade C2b sublineage that includes strain A23EC. These plasmids showed a 99% percentage of identity to pA23EC, although the coverage (*i.e.* the degree of overlap) varied between 76% and 99%. A comparison of the 12 pA23EC-like plasmids identified is shown in Figure 4. The % coverage and elements that are absent in other plasmids relative to pA23EC are shown in Table 2. We see that two areas tend to get lost as the % overlap decreases. The first area is located between 50 kb and 80 kb and includes the genes *nemR*, *nemA* (involved in protection against oxidative stress) (Gray et al., 2013), the virulence gene *senB* and the Col156 replicase *repA*. The second area that is prone to deletion is located between positions 110 and 120 kb and includes the iron acquisition genes *iucD*, *iutA*, the partitioning system *parAB* and *vapBC*, and the addiction systems *ccdAB*. Tetracycline resistance is only lost in one of the plasmids (pTO217_2).

3.6 Mobilization properties

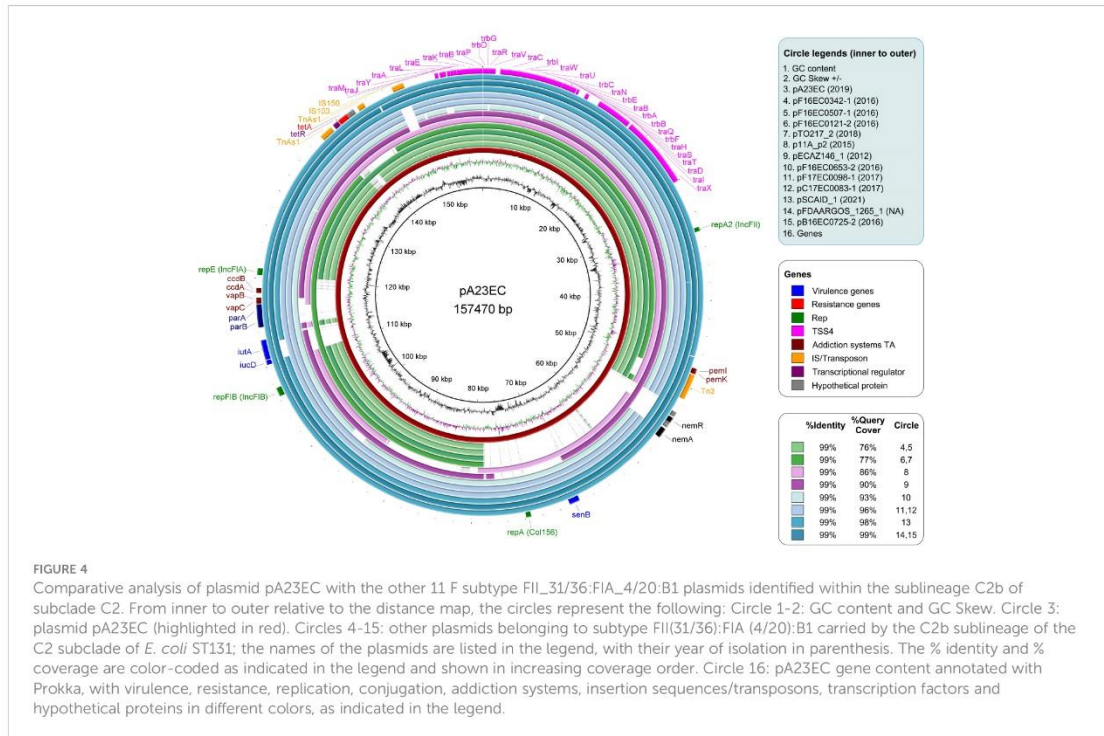
In terms of propagation, the plasmid pA23EC was classified as self-transmissible (conjugative) based on the presence of a complete

set of mobilization genes, which includes an *oriT* sequence, the type F relaxase protein (MOBF) and the type IV secretion system (TSS4) (Smillie et al., 2010). The type IV coupling protein (T4CP) showed intact domains (Garcillán-Barcia et al., 2020). We tested the conjugation ability of pA23EC at two temperatures, 20°C (the approximate temperature in the field) and 37°C (body temperature). As a recipient, we used a standard recipient strain C600^{Rif^r}. We did not detect a low frequency of conjugation and this frequency did not differ significantly depending on the temperature, with a frequency of 2.65×10^{-5} at 37°C and a frequency of 2.82×10^{-5} at 20°C (*t*-student, $p > 0.05$).

4 Discussion

Here we describe the isolation of a strain (A23EC) from a spinach sample at point-of-sale in Mexico and present a detailed genomic characterization of this isolate. Based on its sequence, this strain belongs to the C2 subclade of ST131, which is recognized as a pandemic clone that is highly virulent, multidrug resistant, and widely distributed around the world (Petty et al., 2014).

A phylogenetic analysis of all complete genomes corresponding to ST131 *E. coli* deposited in the Genbank database as of June 2022, places A23EC in a monophyletic sublineage of subclade C2, which we named C2b, clustered with seventeen other strains. These 18



genomes showed four unique commonalities, illustrated in **Figure 1**: 1) They carry a *TnMB1860* transposon structure flanked by IS26 elements. This transposon is chromosomally integrated in all cases and its chromosomal integration site in these genomes is consistent with a single capture event. 2) They carry a PAI II₅₃₆-like pathogenicity island with an additional *cnf1* gene. 3) They consistently belong to virotype E. 4) Thirteen of the eighteen isolates (including A23EC) also carry a F(31,36):A(4,20):B1 plasmid. We did not detect this pMLST type in any other ST131 sample included in our analysis, suggesting that it is specific for sublineage C2b samples.

By contrast, strains belonging to the C2a sublineage included in the analysis lack the *TnMB1860* transposon and frequently carry *bla*_{CTX-M-15} in plasmids, belong mostly to virotypes A or C (only two out of thirteen belong to virotype E); and consistently have F2:A-B- plasmids when plasmids are present.

Note that all strains belonging to sublineage C2a were collected before 2014 (mean isolation date, 2009), whereas 16 of the 18 strains belonging to sublineage C2b were collected after 2014 (mean collection date, 2017), suggesting that C2b represents an emerging sublineage of the C2 subclade; this could be confirmed by further analysis with a larger number of strains.

Recent studies of ST131 clade C clinical strain collections already point to the emergence of new lineages of subclade C2 exhibiting higher virulence and antibiotic resistance. These virulent lineages are consistent with C2b, although in these studies, the identification of genomic markers was less comprehensive because most of the sequences were not completely assembled. Specifically,

one study looked into the association of the gene *papGII* with the expansion of ST131 (Biggel et al., 2022). This report noted a large expansion of *papGII+* isolates within the C2 subclade and distinguished three *papGII+* sublineages: L1, L2 and L3. We noticed that the three fully sequenced strains from that study correspond to sublineage C2b in our analysis (marked with a triangle next to the accession number in **Figure 1**) and carry all the genetic markers that we defined as diagnostic for C2b. In that study, these strains were ascribed to L1 sublineage of *papGII+* C2 strains (along with 233 additional samples). The L1 sublineage was defined by the dominant presence of F(31,36):A(4,20):B1 alleles in IncF plasmids, and by the dominant presence of *bla*_{CTX-M-15} as ESBL-encoding gene; further, the sub-branch they were ascribed to, L1a, consisting of 184 sequences is (like C2b) characterized by the insertion of *TnMB1860* in the vicinity of the *metG* gene and by the presence of the two virulence genes *hly/cnf1* in the *papGII+* PAI. Thus, our proposed C2b sublineage appears to align perfectly with the L1a sub-branch of the Biggel et al., 2022 study (Biggel et al., 2022). They found two additional distinct *papGII+* sublineages within the C2 subclade. Given that these additional sublineages (L2 and L3) were less frequent and more geographically restricted (Ludden et al., 2020; Biggel et al., 2022), their absence in our study can likely be attributable to our much smaller sample size.

A second study identified a monophyletic cluster of 22 C2 strains enriched for virulence and for ARG markers that was named by the authors "C2 subset" (Pajand et al., 2021). Similar to our proposed C2b sublineage, this C2 subset was characterized by the presence of *hlyABCD* virulence genes found in a PAI II₅₃₆-like

TABLE 2 Genetic elements that are absent relative to pA23EC; pA23EC-related plasmids are listed in decreasing order of overlap.

Plasmid	% query cover	<i>RepA</i>	<i>tetAR</i>	<i>nemR</i>	<i>nemA</i>	<i>senB</i>	<i>iucD</i>	<i>iutA</i>	<i>parAB</i>	<i>vapBC</i>	<i>pemIK</i>	<i>ccdAB</i>	Tn3	IS150
pA23EC	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pB16EC0725-2	99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pFDAARGOS_1265_1	99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pSCAID_1	98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pF17EC0083-1	96	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pF17EC0098-1	96	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pF16EC0653-2	93	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pECAZ146	90	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
p11A_p2	86	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
pTO217_2	77	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
pF16EC0121-2	77	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
pF16EC0507-1	76	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
pF16EC0342-1	76	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

genomic island containing *cnf1*, by largely belonging to virotype E (therefore being *papGII+*), and by frequently carrying plasmids with F31 or F36:A4:B1 replicons. This study also describes the presence of *aac(3)-IIa* and of a *IS15DIV*-bounded transposon with *aac(6')-lb-cr*, *bla_{OXA-1}*, *ΔcatB3*, although they report the frequent presence of *aac(3)-IIIc* instead of that of *aac(3)-IIe* (an arrangement similar to that of MB1860TU_A, given that *IS15DIV* is very closely related to IS26), and *bla_{CTX-M-15}* with an *ISEcp1* upstream of and in the same orientation as *bla_{CTX-M-15}*, the reversed *wbuC* and a Tn2 transposon (possibly MB1860TU_B). The concordance between the markers associated with this “C2 subset” and our proposed C2b sublineage, is striking.

We noted the presence of a plasmid in strain A23EC. This plasmid (named pA23EC) was classified as PTU-FE by COPLA and has four replicons, three of which belong to incompatibility group F: F(31,36):A(4,20):B1, which can be annotated as F::A::B1. As it happens, PTU-FE F::A::B1 is one of four PTU-replicon combinations previously proposed to mediate most of the flow of resistance and virulence genes between food and clinical strains, so the present work supports the idea that the plasmid flow between food and clinical strains is preferentially mediated by a specific subset of plasmids (Balbuena-Alonso et al., 2022), although the presence of A23EC in food may be incidental in this case. The fourth replicon belongs to the Col156 type, which has been previously described in isolates of the C1 subclade, carrying CTX-M-14 or -27 (Kondratyeva et al., 2020) (seen also in Figure 1). The presence of Col156 replicons, which are infrequent, in separate subclades of ST131 raises the possibility of plasmid exchanges across ST131 subclades.

Plasmid pA23EC had a complete set of mobilization genes, suggesting that this plasmid is capable of conjugation. Indeed, we detected conjugation at both 20 and 37°C. Conjugation frequencies were similar at both temperatures, which is surprising, as lower temperature slows growth down; however, it appears that the

frequency of conjugation of A23EC to the C600^{Rif^r} recipient strain is not influenced by incubation temperature. Thus, our report is the first to show efficient conjugation for a subclade C2 strain of ST131 at a temperature under 37°C. These observations suggest that pA23EC has the potential to spread *via* conjugation, not only in human hosts but also in environmental reservoirs. Also note that pA23EC is classified as PTU-FE, which exhibits a host range of III on a six-grade scale, with a level of promiscuity to the level of family, and therefore has the potential to contribute to genetic exchange across multiple species in the Enterobacteriaceae.

A23EC is a multidrug-resistant strain, with resistance to aminoglycosides, penicillin, cephalosporins, tetracyclines, quinolones and monobactam. The prevalence of strains that are resistant to all first-line drugs is rising at an alarming rate (Manges, 2016), and multidrug-resistant ExPEC has been categorized by the WHO as a high-risk pathogen of critical priority (Tacconelli et al., 2018). Genotypically, we found nine ARGs in A23EC. Six of these mapped to TnMB1860 in the chromosome, in two separate TUs. The first TU (MB1860TU_A) carried *aac(6')-lb-cr*, *bla_{OXA-1}*, *ΔcatB3*, *aac(3)-IIe* and *tmrB*, whereas the second TU (MB1860TU_B) carried *bla_{CTX-M-15}*. Two additional ARGs were found elsewhere in the chromosome >1 Mb away from TnMB1860, namely *aac(3)-IIa* and *mdfA*; *tetA/tetR* were the only ARGs found in the pA23EC plasmid.

The ARGs that we identified are likely responsible for the observed resistance to penicillins and first-generation cephalosporins (*bla_{OXA-1}* and *bla_{CTX-M-15}*), to synthetic cephalosporins (*bla_{CTX-M-15}*), monobactams (*bla_{CTX-M-15}*), (Zhu et al., 2022), fluoroquinolones (*aac(6')-lb-cr*, and mutations at position S83L, D87N of gyrase and position S80L of ParC (Redgrave et al., 2014; Huseby et al., 2017), to gentamicin (*aac(3)-IIe*), to tobramycin (*aac(6')-lb-cr* and *aac(3)-IIe*), to amikacin (*aac(6')-lb-cr*, intermediate resistance) (Ojdana et al., 2018; Stogios et al., 2022) and to tetracycline (*tetA/tetR*) (Møller et al., 2016).

The genes *mdfA* and *tmrB* could enhance resistance to a variety of drugs rather than being primarily responsible for resistance to a specific drug. *MdfA* (also known as *cmlA* or *cmr*) is a proton-dependent pump with a very wide range of substrates that include chloramphenicol, erythromycin, roxithromycin and certain aminoglycosides and fluoroquinolones (Edgar and Bibi, 1997). *TmrB* is an ATP-binding membrane protein that protects against tunicamycin exposure, binding tunicamycin and functioning either as an efflux pump or as a permeability barrier for this drug (Noda et al., 1992; Noda et al., 1995). Given that tunicamycin is an experimental drug not used as an antibiotic in the clinic or as growth promoter for animals, the frequent presence of the *tmrB* gene in resistance-determining regions (Grevskott et al., 2020; Pungpian et al., 2022) is intriguing and points to a possible role as modulator of resistance to other antibiotics.

Chloramphenicol acetyl transferases acetylate the antibiotic chloramphenicol at the 30-hydroxyl position using acetyl coenzyme as an acetyl donor (White et al., 1999). *CatB3* is a B-type acetyltransferase, which tends to have low activity against chloramphenicol, and forms homotrimers. Trimer formation requires the C-terminal α -helical domain and is important for catalysis because the acetyl acceptor site of each protein is located in a pocket formed between monomers of the trimer. Therefore, the loss of the C-terminal α -helical domain in A23EC's *ΔcatB3* is expected to destabilize the trimer (Alcala et al., 2020). Belonging to a CAT family with low activity against chloramphenicol to begin with and having a truncation that likely suppresses its catalytic activity could explain the sensitivity of A23EC to chloramphenicol despite carrying *ΔcatB3*. Indeed, in a previous report, a strain with this exact truncation was reported as sensitive to chloramphenicol (Hubbard et al., 2020). However, the fact that the two deletions observed in *ΔcatB3* of A23EC are in-frame, and that this allele is fully conserved in our proposed C2b sublineage and even in other STs (strain CP048934.1 is classified as ST315) suggests that *ΔcatB3* might retain some residual function that is being maintained through selection.

One of the C2b genomes (strain 11A CP049077.2) carries the *TnMB1860* transposon integrated in the chromosome and also in plasmid p11A_2. This results in a gene dosage duplication for all the genes encoded in *TnMB1860* that likely makes this transposon structure and all the ARGs that it contains redundant in strain 11A. The concurrent presence of a given ARG in a chromosome and in a plasmid within the same isolate is not uncommon and is interpreted as an intermediate stage in the incorporation of genetic content from a plasmid into the chromosome (Wang et al., 2022). This interpretation is also consistent with the incomplete penetrance of the F(31,36):A(4,20):B1 plasmid in sublineage C2b, which appears to have been lost independently four times (Figure 1).

The A23EC strain bears the seven virulence markers that are characteristic of ExPEC, as expected for ST131 (Figure S1) (Johnson et al., 2003; van Hoek et al., 2016); the presence of *chuA*, *fyuA*, and *yfcV* identifies A23EC as a potentially UPEC strain and its *papGII+* status suggests it may be particularly virulent. Indeed, the PapGII fimbrial tip adhesin was shown to promote inflammation in renal tissue through transcriptional reprogramming of kidney cells

(Biggel et al., 2020), and *papGII+* strains have been reported to be enriched in blood isolates relative to urine/UTI infections (Ambite et al., 2019). Other virulence genes in A23EC including P fimbriae, hemolysins, siderophores, toxins and capsular synthesis, all located within PAIs, have previously been linked to the development of invasive infections (Sabaté et al., 2006; Tsoumtsas Meda et al., 2022). Outside PAIs, we identified *fimH*, which is associated with adherence on biotic and abiotic surfaces (Cookson et al., 2002), and *iss*, *sitA* and *ompT*, which are genes associated with serum resistance and favoring colonization and invasion mainly described in APEC strains (Olsen et al., 2012), as well as the presence of toxin gene *usp* associated with strains causing pyelonephritis, prostatitis and bacteremia (Nipič et al., 2013).

A high virulence of the C2b sublineage of the C2 subclade is also supported by the sources of isolation of C2b samples. Out of eighteen samples, ten were isolated from patients suffering from septicemia (58.8%) and none from urine. For comparison, out of thirteen C2a samples, five were isolated from urine (38.5%) and only one was isolated from the bloodstream (7.7%). Consistent with these observations, Pajand et al., 2021 report that the “C2 subset” (which as explained above aligns with our proposed C2b sublineage) accounted for the excess resistance and virulence of subclade C2 relative to C1 subclade strains (Pajand et al., 2021). However, the observed difference in sample origin between the C2a and C2b sublineages of the C2 subclade could also be attributed to unknown variables affecting the sampling and is based in both cases on a small number of samples.

Based on epidemiological surveillance studies that have been carried out in different parts of the world in the “One Health” context, non-animal agricultural products have been proposed to be important vectors for the circulation of multidrug-resistant ExPEC strains between humans, animals and the environments (Meena et al., 2023). Our report of an isolate belonging to the C2 subclade of ST131 contaminating green leafy vegetables adds support to this hypothesis. We searched for additional relevant reports in the literature. Table S4 lists examples of *E. coli* strains isolated from vegetables, along with their phylotypes (when known) and their corresponding reference. A few sequence types stand out, namely ST10, ST38, ST23, ST69 and ST155, which to our knowledge have been independently reported 8, 4, 3, 3, and 3 times, respectively out of a total of 36 annotated examples. Note that while most of the isolates reported likely represent commensals (based on their phylotype), about 1/3 of them (including ST69) belong to likely ExPEC phylotypes (B2, and D), supporting the idea that agricultural products can indeed serve as vectors for the transmission of ExPEC strains.

Humans represent the main reservoirs of *E. coli* ST131 by colonizing the intestine (Morales Barroso et al., 2018; Sarkar et al., 2018; Johnson et al., 2022). When isolated in foods, the source of ST131 *E. coli* are typically animal products such as meat and dairy products (Platell et al., 2011; Liu et al., 2018) and the C2 (O25:H4/H30) subclade of *E. coli* is much less frequent in foods other ST131 lineages such as H22 (Manges, 2016; Massella et al., 2020). The isolation of a *bla*_{CXT-M-15}-bearing ST131 strain from an agricultural product has only been previously reported once, from a

bitter cucumber imported from the Dominican Republic (Müller et al., 2016), and we ignore further details about its molecular classification. Thus, to our knowledge, this is the first report of an ST131 clone belonging to the C2 subclade (O25:H4/H30) contaminating green leafy vegetable. The isolation of an emerging, potentially uropathogenic strain of ST131 from spinach is relevant to public health because the consumption of fresh produce has increased as a result of a healthier lifestyle (Castro-Rosas et al., 2012).

Three other strains of the C2b sublineage described here were isolated from wastewater (Figure 1). Further, ST131 clade C strains have been observed to survive wastewater treatment and release to surface water (Tausova et al., 2012; Zurfluh et al., 2013; Müller et al., 2016). Thus, A23EC could have reached spinach *via* contaminated water. Admittedly, the present study cannot determine the point at which A23EC contaminated the spinach, and it is therefore possible that contamination happened after the spinach was harvested (during processing, transport or at the supermarket itself) but we can say that this strain is able to persist in spinach long enough for transmission. Whether the ability of A23EC and possibly other C2b strains to persist in fresh vegetables represents a new adaptation or it was simply previously missed is unclear. The presence of virulence factors facilitating adherence to human and animal cells (*papABCD*, *papGII*, *iha*, *yfcV*, *kpsm-TII-k5*, *fimABCDEFGHI* and *csgABCDEFG*) (Sarowska et al., 2019) may be relevant. This is particularly true of adhesins CsgA and CsgB, which have been described to be significantly involved in adhesion and colonization in spinach leaves (Saldaña et al., 2011; MacArisin et al., 2012), and allow their proliferation on the food surface through the formation of biofilms (Zhao et al., 2022). In addition, previous studies have demonstrated the ability of *E. coli* strains to reside within the internal cavity of stomata and internal tissues; this internalization protects the bacteria from disinfecting and bactericidal products, thereby increasing their survival. Internalization also contributes to inefficient washing and sanitizing treatments in vegetables (Gullian-Klanian and Sánchez-Solis, 2018; Querido et al., 2020). However, these previous studies have focused on STEC and EHEC strains and may have missed the presence of ExPEC in these foods.

Some reports interpret the occurrence of ST131 strain in different hosts such as companion and food animals or in different environmental niches such as sewage and other aquatic environments as overflow from its main niche (Melo et al., 2019; Finn et al., 2020); in contrast, other studies report specialization in ST131 strains depending on their origin, suggesting that they are adapting to different niches. This raises complex questions about the role of reservoirs in ST131 evolution and spread (Bonnet et al., 2021; Denamur et al., 2021). The isolation of ST131 strains in foods such as A23EC paves the ground for understanding the epidemiology and evolutionary dynamics of ST131 through rigorous and systematic monitoring using selected molecular markers.

In conclusion, our results add to previous knowledge about the global dissemination of ST131 by confirming the emergence of a distinct sublineage of subclade C2 (C2b), that has the potential to be

highly pathogenic and that bears a transposon structure that has the potential to facilitate the evolution of carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing enterobacterales (Shropshire et al., 2021). The genetic content of virulence and resistance genes and associated mobilization elements described here for the A23EC strain, together with the plasticity of *E. coli* ST131 genome, suggests that this ExPEC strain has the potential to evolve persistence in new environments and to infect humans and/or animals through new routes of transmission. These observations call for a more comprehensive surveillance and monitoring system for ExPEC strains in non-clinical settings.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary material.

Author contributions

MB-A organized the database and performed the formal analysis. MB-A, GC-C, EC-L, and MC participated in the research. MC, PL-Z, and RR-G supervised the experimental and bioinformatics analysis. MC performed extensive review of the original draft. RR-G performed resources and project administration and funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) [CB-2017-2018/A1-S-22136]. The CONACyT also provided a fellowship [589143 to MB-A]. We are also grateful for the UC MEXUS-CONACYT Postdoctoral Fellowship 2017-2019 and the CONACYT National Postdoctoral Fellowship across “Convocatoria de Estancias Posdoctorales por México 2020” during the development of the research to GC-C [335026].

Acknowledgments

The authors thank Margarita Maria de la Paz Hernández Arenas, Candelario Vázquez Cruz and Miguel Castañeda Lucio from “Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias” of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, for their invaluable contribution, guidance and support to the development of this work.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1237725/full#supplementary-material>

References

- Alcala, A., Ramirez, G., Luna, O., Nguyen, K., Vazquez, D., Tan, K., et al. (2020). Structural and functional characterization of three Type B and C chloramphenicol acetyltransferases from *Vibrio* species. *Protein Sci.* 29 (3), 695–710. doi: 10.1002/pro.3793
- Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., and Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12 (1), 402. doi: 10.1186/1471-2164-12-402
- Ambite, I., Butler, D. S. C., Stork, C., Grönberg-Hernández, J., Köves, B., Zdziarski, J., et al. (2019). Fimbriae reprogram host gene expression – Divergent effects of P and type 1 fimbriae. *PLoS Pathog.* 15 (6), 1–30. doi: 10.1371/journal.ppat.1007671
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., et al. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44 (W1), W16–W21. doi: 10.1093/nar/gkw387
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-9-75
- Balbuena-Alonso, M. G., Cortés-Cortés, G., Kim, J. W., Lozano-Zarain, P., Camps, M., and del Carmen Rocha-Gracia, R. (2022). Genomic analysis of plasmid content in food isolates of *E. coli* strongly supports its role as a reservoir for the horizontal transfer of virulence and antibiotic resistance genes. *Plasmid* 123–124. doi: 10.1016/j.plasmid.2022.102650
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19 (5), 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Barrios-Villa, E., Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Arenas-Hernández, M. M. D. L. P., Martínez de la Peña, C. F., Martínez-Laguna, Y., et al. (2018). Adherent/invasive *Escherichia coli* (AIEC) isolates from asymptomatic people: New *E. coli* ST131 O25:H4/H30-Rx virotypes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrobiol.* 17 (1), 1–11. doi: 10.1186/s12941-018-0295-4
- Ben Salem, R., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., et al. (2014). Inc11 plasmids carrying blaCTX-M-1or blaCMY-2genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microbial Drug Resist* 20 (5), 495–500. doi: 10.1089/mdr.2013.0224
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Lau, B. Y., Hoard, G., Winsor, G. L., et al. (2017). IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* 45 (W1), W30–W35. doi: 10.1093/nar/gkx343
- Biggel, M., Moons, P., Nguyen, M. N., Goossens, H., and Van Puyvelde, S. (2022). Convergence of virulence and antimicrobial resistance in increasingly prevalent *Escherichia coli* ST131 papGII+ sublineages. *Commun. Biol.* 5 (1), 1–10. doi: 10.1038/s42003-022-03660-x
- Biggel, M., Xavier, B. B., Johnson, J. R., Nielsen, K. L., Fridmodt-Møller, N., Matheussen, V., et al. (2020). Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nat. Commun.* 11 (1), 1–15. doi: 10.1038/s41467-020-19714-9
- Bonnet, R., Beyrouthy, R., Haenni, M., Nicolas-Chanoine, M. H., Dalmasso, G., and Mader, J. Y. (2021). Host colonization as a major evolutionary force favoring the diversity and the emergence of the worldwide multidrug-resistant *Escherichia coli* st131. *MBio* 12 (4), 1–12. doi: 10.1128/mBio.01451-21
- Bortolonia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., et al. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother* 75 (12), 3491–3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., et al. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother* 58 (7), 3895–3903. doi: 10.1128/AAC.02412-14
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., and Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *Int. J. Food Microbiol.* 156 (2), 176–180. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., and Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (1), 58–65. doi: 10.1111/1758-2229.12019
- CLSI (2022). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 32nd edition: M100s*. (Pennsylvania, USA)
- Cookson, A. L., Cooley, W. A., and Woodward, M. J. (2002). The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int. J. Med. Microbiol.* 292 (3–4), 195–205. doi: 10.1078/1438-4221-00203
- Cortés-Cortés, G., Lozano-Zarain, P., Torres, C., Castañeda, M., Sánchez, G. M., Alonso, C. A., et al. (2016). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* strains producers of extended-spectrum and CMY-2 type beta-lactamases, isolated from turtles in Mexico. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 16 (9), 595–603. doi: 10.1089/vbz.2014.1725
- Decano, A. G., Tran, N., Foori, H., Awadi, B., Campbell, L., Ellison, K., et al. (2021). Plasmids shape the diverse accessory resistomes of *Escherichia coli* ST131. *Access Microbiology* 3 (1), acmi000179. doi: 10.1099/acmi.0.000179
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D. (2011). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (1), 37–54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., and Bonnet, R. (2020). Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.02065
- Dhanji, H., Patel, R., Wall, R., Doumith, M., Patel, B., Hope, R., et al. (2011). Variation in the genetic environments of bla CTX-M-15 in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(5), 1005–1012. doi: 10.1093/jac/dkr041
- Edgar, R., and Bibi, E. (1997). MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol.* 179 (7), 2274–2280. doi: 10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997
- Finn, T. J., Scriver, L., Lam, L., Duong, M., Peirano, G., Lynch, T., et al. (2020). A comprehensive account of *Escherichia coli* sequence type 131 in wastewater reveals an abundance of fluorquinolone-resistant clade strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 86 (4), 1–11. doi: 10.1128/AEM.01913-19
- Forde, B. M., Ben Zakour, N. L., Stanton-Cook, M., Phan, M. D., Totsika, M., Peters, K. M., et al. (2014). The complete genome sequence of *Escherichia coli* EC958: A high quality reference sequence for the globally disseminated multidrug resistant *E. coli* O25b:H4-ST131 clone. *PLoS One* 9 (8), 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0104400
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., Vielva, L., and de la Cruz, F. (2020). MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), 295–308. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_21
- Gizaw, Z. (2019). Public health risks related to food safety issues in the food market: A systematic literature review. *Environ. Health Prev. Med.* 24 (1), 1–21. doi: 10.1186/s12199-019-0825-5
- Gray, M. J., Wholey, W. Y., Parker, B. W., Kim, M., and Jakob, U. (2013). NemR is a bleach-sensing transcription factor. *J. Biol. Chem.* 288 (19), 13789–13798. doi: 10.1074/jbc.M113.454421
- Grevskott, D. H., Salvà-serra, F., Moore, E. R. B., and Marathe, N. P. (2020). Nanopore sequencing reveals genomic map of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases carried by *Escherichia coli* strains isolated from blue mussels (*Mytilus edulis*) in Norway. *BMC Microbiology* 20(1), 134. doi: 10.1186/s12866-020-01821-8

- Gullian-Klanian, M., and Sánchez-Solis, M. J. (2018). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 on the epicarp of fresh vegetables and fruits. *Braz. J. Microbiol.* 49 (1), 104–111. doi: 10.1016/j.bjm.2017.08.001
- Hubbard, A. T. M., Mason, J., Roberts, P., Parry, C. M., Corless, C., Aartsen, J., et al. (2020). Piperacillin/tazobactam resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* due to IS26-mediated amplification of bla. *Nat. Commun.* 11 (1), 1–9. doi: 10.1038/s41467-020-18668-2
- Huisman, J. S., Benz, F., Duxbury, S. J. N., de Visser, J. A. G. M., Hall, A. R., Fischer, E. A. J., et al. (2022). Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. *Plasmid* 121, 102627. doi: 10.1016/j.plasmid.2022.102627
- Huseby, D. L., Pietsch, F., Brandis, G., and Teghehall, A. (2017). Mutation supply and relative fitness shape the genotypes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 34 (5), 1029–1039. doi: 10.1093/molbev/msx052
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., and Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 53 (8), 2410–2426. doi: 10.1128/JCM.00008-15
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., and Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J. Antimicrob. Chemother.* 76, 101–109. doi: 10.1093/jac/ckaa390
- Johnson, J. R., Clabots, C., Porter, S. B., Bender, T., Johnston, B. D., and Thurs, P. (2022). Intestinal persistence of colonizing *Escherichia coli* strains, especially ST131-H30, in relation to bacterial and host factors. *J. Infect. Dis.* 225 (12), 2197–2207. doi: 10.1093/infdis/jiab638
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., et al. (2003). Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (7), 2161–2168. doi: 10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003
- Kaas, R. S., Leekitchareonphon, P., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS One* 9 (8), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0104984
- Kondratyeva, K., Salmon-Divon, M., and Navon-Venezia, S. (2020). Meta-analysis of pandemic *Escherichia coli* ST131 plasmidome proves restricted plasmid-clade associations. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-56763-7
- Letunic, I., and Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49 (W1), W293–W296. doi: 10.1093/nar/gkab301
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22 (13), 1658–1659. doi: 10.1093/bioinformatics/btl158
- Li, X., Xie, Y., Liu, M., Tai, C., Sun, J., Deng, Z., et al. (2018). OriTfinder: A web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1), W229–W234. doi: 10.1093/nar/gky352
- Liu, C. M., Stegger, M., Aziz, M., Johnson, T. J., Waits, K., Nordstrom, L., et al. (2018). *Escherichia coli* ST131-H22 as a foodborne uropathogen. *MBio* 9 (4), 1–11. doi: 10.1128/MBIO.00470-18
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., and Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D687–D692. doi: 10.1093/nar/gky1080
- Lloyd, A. L., Henderson, T. A., Vigil, P. D., and Mobley, H. L. (2009). Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of Bacteriology* 191 (11), 3469–3481. doi: 10.1128/JB.01717-08
- Lopez, L., Vin, L., Cisneros, M., Go, S. L., Sa, H., and Morales, I. (2014). *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(3), 809–814. doi: 10.1093/jac/dkt405
- Ludden, C., Decano, A. G., Jamroz, D., Pickard, D., Morris, D., Parkhill, J., et al. (2020). Genomic surveillance of *Escherichia coli* ST131 identifies clonal expansion and serial replacement of subclones. *Microbial Genomics* 6(4), e000352. doi: 10.1099/mgen.0.000352
- MacArin, D., Patel, J., Bauman, G., Giron, J. A., and Sharma, V. K. (2012). Role of curli and cellulose expression in adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to spinach leaves. *Foodborne Pathog. Dis.* 9 (2), 160–167. doi: 10.1089/fpd.2011.1020
- MacFaddin, J. F. (2003). *MacFaddin's manual of biochemical tests for the identification of clinically important bacteria* (Buenos Aires, Argentina: Williams and Wilkins Co).
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (3), 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Manges, A. R. (2016). *Escherichia coli* and urinary tract infections: The role of poultry-meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22 (2), 122–129. doi: 10.1016/j.cmi.2015.11.010
- Massella, E., Reid, C. J., Cummins, M. L., Anantanawat, K., Zingali, T., Serrano, A., et al. (2020). Snapshot study of whole genome sequences of *Escherichia coli* from healthy companion animals, livestock, wildlife, humans and food in Italy. *Antibiotics* 9 (11), 1–22. doi: 10.3390/antibiotics9110782
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (7), 3348–3357. doi: 10.1128/AAC.00419-13
- Meena, P. R., Priyanka, P., and Singh, A. P. (2023). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork” *Let. Appl. Microbiol.* 76 (1), 1–12. doi: 10.1093/lambio/ovac016
- Meena, P. R., Yadav, P., Hemlata, H., Tejavath, K. K., and Singh, A. P. (2021). Poultry-origin extraintestinal *Escherichia coli* strains carrying the traits associated with urinary tract infection, sepsis, meningitis and avian colibacillosis in India. *J. Appl. Microbiol.* 130 (6), 2087–2101. doi: 10.1111/JAM.14905
- Melo, L. C., Haenni, M., Saras, E., Duprilot, M., Nicolas-Chanoine, M. H., and Madec, J. Y. (2019). Emergence of the C1-M27 cluster in ST131 *Escherichia coli* from companion animals in France. *J. Antimicrob. Chemother.* 74 (10), 3111–3113. doi: 10.1093/jac/dkz304
- Møller, T. S. B., Overgaard, M., Nielsen, S. S., Bortolaia, V., Sommer, M. O. A., Guardabassi, L., et al. (2016). Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* 1–8. doi: 10.1186/s12866-016-0649-z
- Morales Barroso, I., López-Crero, L., Navarro, M. D., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Pascual, A., and Rodríguez-Baño, J. (2018). Intestinal colonization due to *Escherichia coli* ST131: Risk factors and prevalence. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7 (1), 1–6. doi: 10.1186/s13756-018-0427-9
- Mota-Bravo, L., Camps, M., Muñoz-Gutiérrez, I., Tatarenkov, A., Warner, C., Suarez, I., et al. (2023). Detection of horizontal gene transfer mediated by natural conjugative plasmids in *E. coli*. *J. Visual. Exp.* 193, 1–23. doi: 10.3791/64523
- Müller, A., Stephan, R., and Nüesch-Inderbinen, M. (2016). Distribution of virulence factors in ESKAP-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Sci. Tot. Environ.* 541, 667–672. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.135
- Nicolas-Chanoine, M.-H., Bertrand, X., and Madec, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27 (3), 543. doi: 10.1128/CMR.00125-13
- Nipič, D., Podlesek, Z., Budič, M., Črnigoj, M., and Žgur-Bertok, D. (2013). *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, USP, is a bacteriocin-like genotoxin. *J. Infect. Dis.* 208 (10), 1545–1552. doi: 10.1093/infdis/jit480
- Noda, Y., Takatsuki, A., Yoda, K., and Yamasaki, M. (1995). TmrB protein, which confers resistance to tunicamycin on *Bacillus subtilis*, binds tunicamycin. *Biochim. Biophys. Acta* 1451 (59(2)), 321–322. doi: 10.1016/bbb.59.321
- Noda, Y., Yoda, K., and Yamasaki, M. (1992). TmrB protein, responsible for tunicamycin resistance of *Bacillus subtilis*, is a novel ATP-binding membrane protein. *J. Bacteriol.* 174 (13), 4302–4307. doi: 10.1128/jb.174.13.4302-4307.1992
- Ojdana, D., Sienko, A., Sacha, P., Majewski, P., Wiecek, P., Wiecek, A., et al. (2018). Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. *Adv. Med. Sci.* 63 (1), 9–13. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.004
- Olsen, R. H., Christensen, H., and Bisgaard, M. (2012). Comparative genomics of multiple plasmids from APEC associated with clonal outbreaks demonstrates major similarities and identifies several potential vaccine-targets. *Veterinary Microbiol.* 158 (3–4), 384–393. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.008
- Pajand, O., Rahimi, H., Darabi, N., Roudi, S., Ghassemi, K., Aarestrup, F. M., et al. (2021). Arrangements of Mobile Genetic Elements among Virotype E Subpopulation of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Strains with High Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Content. *mSphere* 6 (4), e0055021. doi: 10.1128/mSphere.00550-21
- Perry, R. D., Balbo, P. B., Jones, H. A., Fetherston, J. D., and Demoll, E. (1999). Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: Biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* 145 (5), 1181–1190. doi: 10.1099/13500872-145-5-1181
- Petty, N. K., Zakour, N. L. B., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B. M., et al. (2014). Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States America* 111 (15), 5694–5699. doi: 10.1073/pnas.1322678111
- Pitout, J. D. D. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3 (JAN), doi: 10.3389/fmicb.2012.00009
- Pitout, J. D. D., and Finn, T. J. (2020). The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infection Genet. Evol.* 81 (February), 104265. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104265
- Platell, J. L., Johnson, J. R., Cobbold, R. N., and Trott, D. J. (2011). Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiol.* 153 (1–2), 99–108. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.05.007
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., et al. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 6 (4), 1–27. doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0026-2017
- Price, L. B., Johnson, J. R., Aziz, M., Clabots, C., Johnston, B., Tchesnokova, V., et al. (2013). The epidemic of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio* 4 (6), 1–10. doi: 10.1128/mBio.00377-13
- Pungpian, C., Angkittrakul, S., and Chuanchuen, R. (2022). Genomic characterization of antimicrobial resistance in mcr carrying ESKAP producing

- Escherichia coli from pigs and humans. *Microbiology (Reading, England)* 168 (6), 1–13. doi: 10.1099/mic.0.001204
- Querido, M. M., Paulo, J., Aguiar, L., Neves, P., and Pereira, C. C. (2020). Self-disinfecting surface and infection control. *Colloids Surface B: Biointerfaces* 178 (January), 8–21. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.009
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., and Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 22 (8), 438–445. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007
- Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K. A., Webb, H. E., Fernández-López, R., et al. (2021). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinf.* 22 (1), 1–9. doi: 10.1186/s12859-021-04299-x
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., et al. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat. Commun.* 11 (1), 1–13. doi: 10.1038/s41467-020-17278-2
- Roer, L., Tchesnokova, V., Allsøe, R., Muradova, M., Chattopadhyay, S., Ahrenfeldt, J., et al. (2017). Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. *J. Clin. Microbiol.* 55 (8), 2538–2543. doi: 10.1128/JCM.00737-17
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., and Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. *Clin. Microbiol. Infection* 12 (9), 880–886. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x
- Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicotencatl-Cortes, J., Puente, J. L., and Girón, J. A. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicogenic Escherichia coli O157: H7. *Front. Microbiol.* 2 (MAY). doi: 10.3389/fmicb.2011.00119
- Sarkar, S., Hutton, M. L., Vagenas, D., Ruter, R., Schüller, S., Lyras, D., et al. (2018). Intestinal colonization traits of pandemic multidrug-resistant Escherichia coli ST131. *J. Infect. Dis.* 218 (6), 979–990. doi: 10.1093/infdis/jiy031
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskowska, G., et al. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 11 (1), 1–16. doi: 10.1186/s13099-019-0290-0
- Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004). The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 294 (2–3), 83–94. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.06.026
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30 (14), 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
- Shropshire, W. C., Aitken, S. L., Pifer, R., Kim, J., Bhatti, M. M., Li, X., et al. (2021). IS26-mediated amplification of blaOXA-1and blaCTX-M-15with concurrent outer membrane porin disruption associated with de novo carbapenem resistance in a recurrent bacteraemia cohort. *J. Antimicrobial. Chemother* 76 (2), 385–395. doi: 10.1093/jac/dkaa447
- Siguiar, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34, 32–36. doi: 10.1093/nar/gkj014
- Silkie, S. S., Tolcher, M. P., and Nelson, K. L. (2008). Reagent decontamination to eliminate false-positives in Escherichia coli qPCR. *J. Microbiol. Methods* 72 (3), 275–282. doi: 10.1016/j.mimet.2007.12.011
- Smillie, C., Garcillán-Barcía, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (3), 434–452. doi: 10.1128/MMBR.00020-10
- Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., and Zecconi, A. (2021). Extraintestinal pathogenic escherichia coli: Virulence factors and antibiotic resistance. *Pathogens* 10 (11), 1–25. doi: 10.3390/pathogens10111355
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., et al. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the Escherichia coli epidemic clone ST131. *MBio* 7 (2), 1–15. doi: 10.1128/mBio.02162-15
- Stogios, P. J., Bordeleau, E., Xu, Z., Skarina, T., Evdokimova, E., Chou, S., et al. (2022). Structural and molecular rationale for the diversification of resistance mediated by the Antibiotic_NAT family. *Communications Biology* 5(1), 263. doi: 10.1038/s42003-022-03219-w
- Stothard, P., Grant, J. R., and Van Domselaar, G. (2018). Visualizing and comparing circular genomes using the CGView family of tools. *Briefings Bioinf.* 20 (4), 1576–1582. doi: 10.1093/bib/bbx081
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., and Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27 (7), 1009–1010. doi: 10.1093/bioinformatics/btr039
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18 (3), 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Tausova, D., Dolejska, M., Cizek, A., Hanusova, L., Hrusakova, J., Svoboda, O., et al. (2012). Escherichia coli with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in central Europe. *J. Antimicrobial. Chemother* 67 (5), 1103–1107. doi: 10.1093/jac/dks017
- Tchesnokova, V. L., Rechkina, E., Chan, D., Haile, H. G., Larson, L., Ferrier, K., et al. (2020). Pandemic uropathogenic fluoroquinolone-resistant escherichia coli have enhanced ability to persist in the gut and cause bacteriuria in healthy women. *Clin Infect Dis* 70, 937–939. doi: 10.1093/cid/ciz547
- Tetzschner, A. M. M., Johnson, J. R., Johnston, B. D., Lund, O., and Scheutz, F. (2020). In Silico genotyping of Escherichia coli isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. *J. Clin. Microbiol.* 58 (10), 1–13. doi: 10.1128/JCM.01269-20
- Tsoumts Meda, L. L., Landraud, L., Petracchini, S., Descorps-Declere, S., Perthame, E., Nahori, M. A., et al. (2022). The cnf1 gene is associated with an expanding Escherichia coli ST131 H30Rx/C2 subclone and confers a competitive advantage for gut colonization. *Gut Microbes* 14 (1), 1–20. doi: 10.1080/19490976.2022.2121577
- Van Duijkeren, E., Schink, A.-K., Roberts, M. C., Wang, Y., and Schwarz, S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *J. Med. Libanais* 48 (4), 186–198. doi: 10.1128/microbiol-spec-arba-0019-2017
- van Hoek, A. H. A. M., Stalenhof, J. E., van Duijkeren, E., and Franz, E. (2016). Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant E. coli isolated from broilers, humans on broiler farms and in the general population and UTI patients. *Veterinary Microbiol.* 194 (2015), 55–61. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.008
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., and Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrobial. Chemother* 65 (12), 2518–2529. doi: 10.1093/jac/dkq347
- Walker, D. I., McQuillan, J., Taiwo, M., Parks, R., Stenton, C. A., Morgan, H., et al. (2017). A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Res.* 126, 101–110. doi: 10.1016/j.watres.2017.08.032
- Wang, Y., Batra, A., Schulenburg, H., and Dagan, T. (2022). Gene sharing among plasmids and chromosomes reveals barriers for antibiotic resistance gene transfer. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 377 (1842), 1–11. doi: 10.1098/rstb.2020.0467
- Wang, M., Goh, Y. X., Tai, C., Wang, H., Deng, Z., and Ou, H. Y. (2022). VRprofile2: Detection of antibiotic resistance-associated mobilome in bacterial pathogens. *Nucleic Acids Res.* 50 (W1), 768–773. doi: 10.1093/nar/gkac321
- White, P. A., Stokes, H. W., Bunny, K. L., and Hall, R. M. (1999). Characterization of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS microbiology Letters* 175 (1), 27–35. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb.13598.x
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.* 13 (6), 1–22. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595
- Wingett, S. W., and Andrews, S. (2018). Fastq screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* 7 (0), 1–13. doi: 10.12688/f1000research.15931.1
- Zhao, X., Sun, Y., Ma, Y., Xu, Y., Guan, H., and Wang, D. (2022). Research advances on the contamination of vegetables by Enterohemorrhagic Escherichia coli: pathways, processes and interaction. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 1–15. doi: 10.1080/10408398.2022.2146045
- Zhu, Y., Huang, W. E., and Yang, Q. (2022). Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. *Infection and Drug Resistance* 15, 735–746. doi: 10.2147/IDR.S345574
- Zurfluh, K., Hächler, H., Nüesch-Inderbilen, M., and Stephan, R. (2013). Characteristics of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (9), 3021–3026. doi: 10.1128/AEM.00054-13

Review

Antimicrobial resistance in food-associated *Escherichia coli* in Mexico and Latin America

Lorena BABINES-OROZCO¹, María Guadalupe BALBUENA-ALONSO¹, Edwin BARRIOS-VILLA², Patricia LOZANO-ZARAIN¹, Ygnacio MARTÍNEZ-LAGUNA¹, Rosa DEL CARMEN ROCHA-GRACIA^{1*} and Gerardo CORTÉS-CORTÉS^{1, 3*}

¹Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias, Ciudad Universitaria, San Manuel C.P. 72570 Puebla, México

²Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Unidad Regional Norte, Campus Caborca, Universidad de Sonora, Col. Eleazar Ortiz C.P. 83621 H. Caborca, Sonora, México

³Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA

Received March 23, 2023; Accepted June 11, 2023; Published online in J-STAGE June 29, 2023

The World Health Organization (WHO) considers antimicrobial resistance to be one of the critical global public health priorities to address. *Escherichia coli* is a commensal bacterium of the gut microbiota in humans and animals; however, some strains cause infections and are resistant to antibiotics. One of the most common ways of acquiring pathogenic *E. coli* strains is through food. This review analyzes multidrug-resistant *E. coli* isolated from food, emphasizing Latin America and Mexico, and the mobile genetic elements (MGEs) responsible for spreading antibiotic resistance determinants among bacteria in different environments and hosts. We conducted a systematic search of the literature published from 2015 to 2022 in open access databases and electronic repositories. The prevalence of 11 *E. coli* pathotypes was described, with diarrheagenic *E. coli* pathotypes being the most frequently associated with foodborne illness in different Latin American countries, highlighting the presence of different antibiotic resistance genes mostly carried by IncF-type plasmids or class 1 integrons. Although the global incidence of foodborne illness is high, there have been few studies in Mexico and Latin America, which highlights the need to generate updated epidemiological data from the “One Health” approach, which allows monitoring of the multidrug-resistance phenomenon in *E. coli* from a common perspective in the interaction of human, veterinary, and environmental health.

Key words: food, *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, Mexico, Latin America

INTRODUCTION

Bacterial resistance to antibiotics has a serious impact on public health, which is why the World Health Organization (WHO) considers it one of the critical priorities to be addressed. Foodborne illnesses are the set of diseases caused by the ingestion of food and/or water containing etiological agents in sufficient quantities to affect the health of the consumer. These diseases are characterized by a wide variety of symptoms, such as diarrhea, vomiting, abdominal pain, headache, nausea, and fever; in some cases, there are severe complications, such as sepsis, meningitis, miscarriage, hemolytic uremic syndrome, Reiter’s syndrome, Guillain–Barré syndrome, or even death [1]. About 250 pathogens

have been described that affect humans through contaminated food and beverages. It is estimated that 420,000 people die every year from consuming contaminated food and that 550 million people suffer from diarrheal diseases, of which 230,000 die each year [2]. The etiology of foodborne diseases is varied; viruses, parasites, and bacteria may be involved, with the main agents responsible for mortality being *Norovirus*, *Campylobacter* spp, *Salmonella enterica*, *Salmonella* Typhi, *Taenia solium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* sp, *Listeria monocytogenes*, hepatitis A virus, and *Escherichia coli* (mainly O157:H7) [2]. The latter, being part of the intestinal microbiota, is an important indicator of fecal contamination; its detection in the environment is used to monitor the prevalence,

*Corresponding authors. Rosa del Carmen Rocha-Gracia (E-mail: rochagra@yahoo.com);

Gerardo Cortés-Cortés (E-mail: gccortes@ucsc.edu)

(Supplementary materials: refer to PMC <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2480/>)

©2024 BMFH Press



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License. (CC-BY-NC-ND 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

types, and movement of resistance genes within and between clinical, agricultural, food, community, and environmental settings [3, 4]. It is estimated that 85% of infections caused by *E. coli* are transmitted through food by the fecal-oral route, with cattle and the products or by-products obtained from them being one of the main reservoirs that contaminate food and the environment. This contamination happens through the elimination of the pathogen in their feces, spreading between animals by direct contact, through drinking troughs, shared feed, contaminated grazing sites, or other environmental sources [5].

This review aims to provide an update on the involvement of *E. coli* pathotypes in the development of foodborne diseases as well as the wide range of genetic mechanisms that the bacterium uses to resist the effects of antimicrobials, highlighting the potential for transfer of these determinants through mobile or mobilizable genetic elements. The importance of approaching this phenomenon from the “One Health” point of view, a current approach promoted by the WHO to comprehensively address and contain the spread of the disease, and containing the spread of multidrug-resistant (MDR) bacteria in a comprehensive manner is also discussed.

MATERIALS AND METHODS

A systematic search of the literature was carried out to identify recent bibliographic citations reporting the association of *E. coli* in the development of foodborne illness as well as the mechanisms of resistance to antibiotics most frequently used to treat infections caused by the bacterium. The search was initially performed in the PubMed database, using the following keywords: “*Escherichia coli* in foodborne diseases”, “*Escherichia coli* pathotypes and foodborne diseases”, “Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*”, “Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*”, “Horizontal genetic transference of resistance genes in *Escherichia coli*”, and “Genetic elements carrying antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*”. In order to obtain studies reported in Mexico and Latin America, we also used the Google Scholar search engine and the following keywords: “Foodborne diseases in Mexico”, “ETA in Mexico”, “Foodborne diseases in Latin America”, “Foodborne diseases in Latin America”, “*Escherichia coli* isolated from food”, “*Escherichia coli* isolated from food in Mexico”, “*Escherichia coli* isolated from food in Latin America”, “Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*”, and “Dissemination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*”. A total of 220 articles were retrieved. The articles were selected based on the following criteria: a) to address epidemiological data on foodborne diseases and their associations with *E. coli*, b) to describe virulence determinants in diarrheagenic and extraintestinal pathotypes of *E. coli*, c) to characterize *E. coli* strains isolated from food, d) to determine antibiotic resistance genes in enterobacteria and *E. coli*, and e) to describe the mechanisms and elements of genetic material transfer. This review did not generate data that had to be recorded in repositories with an accession number.

RESULTS

A total of 95 articles and 4 electronic repositories from educational and health institutions were included, which were limited to a publication and/or update period from 2015 to 2022.

Pathotypes of E. coli associated with foodborne diseases in Mexico and Latin America

Among the most frequent infections caused by *E. coli* are enteric and diarrheal diseases. Foodborne diarrheagenic pathotypes of *E. coli* produce virulence factors (VFs) encoded by several important genes widely reported around the world (Table 1) [6, 7]. The group of diarrheagenic pathotypes is composed of enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Shiga toxin-producing *E. coli*/enterohemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) [6, 8]; STEC, one of the most important pathogens causing foodborne diseases, includes *E. coli* O157:H7. Serogroups other than O157 (O26, O45, O103, O111, O121, and O145) are known as non-O157 STEC serogroups and are also related to foodborne diseases. Transmission of an STEC causing infections occurs mainly via the consumption or handling of contaminated food, such as raw or undercooked minced meat products, raw milk, raw vegetables, contaminated raw sprouted seeds, and contact with infected animals [6, 9]. However, although the pathotypes mentioned are highly related to foodborne diseases, there are intestinal pathotypes that have shown severe intestinal involvement, such as adherent-invasive *E. coli* (AIEC). AIEC is a pathotype with particular importance in the last decades due to its frequent presence in patients with Crohn’s disease and ulcerative colitis, which are commonly referred to as inflammatory bowel disease (IBD), and is a relevant pathotype because it is an intestinal bacterium with severe clinical implications [10, 11]. Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) diseases can cause a wide variety of infections at multiple anatomic sites. This group includes uropathogenic *E. coli* (UPEC), neonatal meningitis *E. coli* (NMEC), sepsis-associated *E. coli* (SEPEC), avian pathogenic *E. coli* (APPEC), and a potentially emerging ExPEC lineage called endometrial pathogenic *E. coli* (EnPEC) [12]. ExPEC possess multiple virulence traits and genes (Supplementary Table 1) [12–15], which allow them to invade and adapt to body sites outside the gastrointestinal tract on any surface, such as food products, especially raw meats [13]. The transmission capacity of ExPEC strains is considered to be of great importance due to the variety of diseases they cause. Neonatal meningitis caused by NMEC strains is one of the most common infections, and it contributes to a neonatal mortality rate of 10% and a morbidity rate of 30% [14]. UPEC is one of the main causes of nosocomial infections and community-acquired urinary tract infections [16]. In Mexico alone, 549,984 cases of urinary tract infections have been reported so far in 2023 [17], with *E. coli* being the main etiological agent. Although these infections are treatable, the increase in MDR bacteria among ExPEC strains represents a major challenge, as it implies an increase in health care costs and leads to complications, drug treatment failures, as well as higher morbidity and mortality rates [18].

In Latin America, at least 77 million people get ill each year from consuming contaminated food, up to 9,000 people die each year, and 10–17 cases per 100,000 are children under 5 years of age who manifest hemorrhagic colitis or sporadic infection with enterotoxin-producing *E. coli*. Although *E. coli* is generally considered harmless to humans, certain pathogenic strains can infect the intestinal area and cause severe disease [6]. Studies in different Latin American countries (Table 2) [1, 7, 19–22] have indicated differences in the prevalence of various pathotypes of

E. coli. For example, in Colombia and Nicaragua, most of the reported cases of diarrhea are associated with ETEC, while in Argentina, Mexico, Brazil, Paraguay, and Peru, the most frequent pathotype is EAEC; on the other hand, in Chile, Venezuela, and Uruguay, the main associated pathotype is EPEC [23].

Mexico, like many developing countries, experiences a high incidence of foodborne diseases caused by diarrheagenic strains of *E. coli* found in different foods. These strains show high resistance to first-line antibiotics [22]. In 2017, the General Director of Inocuidad Agroalimentaria, Acuicola y Pesquera del Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reported that 16,000 people die every year due to foodborne diseases in the country [24]. In Mexico, more than 120,000 cases of intestinal infectious diseases

have been reported [25], with diarrheal diseases being the second most common cause of morbidity in children under five years of age, with a mortality rate of 27.78 per 100,000 in children under one year of age and 3.47 per 100,000 in children between one and four years of age [26]. *E. coli* infections are mainly transmitted through food, such as undercooked ground meat, raw milk, salads, leeks, raw potatoes, vegetables, fruits, and other foods [6] often associated with poor hygienic conditions. According to the WHO list of priority antibiotic resistant pathogens published in 2017, *E. coli* resistant to carbapenems and 3rd generation cephalosporins, as well as extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producers, is among the pathogens of critical priority or first attention, as it has acquired resistance to a high number of antibiotics and can cause severe and often lethal infections [9].

Table 1. Intestinal pathotypes of *E. coli* and their main virulence factors

Pathotype	Clinical symptoms	Host	Virulence factor	Virulence gene	Location	References
EHEC/ STEC	Non-bloody diarrhea, abdominal pain, fever and vomiting	Ruminants (bovine), adults, children	Shiga toxin Intimin Enterohemolysin	<i>stx1, stx2</i> <i>eae</i> <i>E-hly(ehxA)</i>	Phage Locus LEE Plasmid	[6, 7]
EAEC	Watery diarrhea with bloodless mucus	Adults, children, travelers to developing countries	AAF/I-V (Fimbriae) Transcriptional Activator Pet (protease SPATE) EASTI Mucinase	<i>aggA, aafA, agg3A-5A</i> <i>aggR</i> <i>pet</i> <i>astA</i> <i>pic</i>	Plasmid/ Chromosome	[6, 7]
EPEC	Acute diarrhea, abdominal pain, vomiting and fever	Children <5 years old, adults with high inoculum	Bundlin Intimin Enterohemolysin	<i>bfpA</i> <i>eae</i> <i>E-hly(ehxA)</i>	Plasmid Locus LEE Plasmid	[6, 7]
ETEC	Acute watery diarrhea	Children <5 years old, adults, immunocompromised, travelers	Heat-stable toxin Heat-labile toxin EASTI	<i>est</i> <i>elt</i> <i>asta</i>	Plasmid/ Chromosome	[6]
EIEC	Dysentery Watery diarrhea	Children <5 years old, adults, immunocompromised, travelers	Invasin A Antigen H	<i>invA</i> <i>ipaH</i>	Plasmid INV	[6]
DAEC	Watery diarrhea without blood	Humans	Adhesin F1845	<i>daaC</i>	Plasmid/ Chromosome	[6, 7]

EHEC: enterohemorrhagic *E. coli*; STEC: Shiga toxin-producing *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*; ETEC: enterotoxigenic *E. coli*; EIEC: enteroinvasive *E. coli*; DAEC: diffusely adherent *E. coli*.

Table 2. Reports of foodborne *E. coli* in Latin American countries

Country	Finding	References
Argentina	The STEC pathotype is endemic in Argentina with a prevalence of approximately 500 cases per year and an incidence of 12 to 14 cases per 100,000 in children under five years of age.	[19]
Colombia	Total prevalence of <i>E. coli</i> of 36.8% (28/76): Meats: 42% (16/38 samples) where 1/16 are STEC and vegetables 31% (12/38 samples) where 1/12 are STEC and 1/12 are EAEC.	[1]
Paraguay	The frequency of pathotypes in pediatric patients is: 34% ETEC, 22% EAEC, 23% EPEC, 15% EIEC, 4% STEC and 3% ETEC/EAEC, 0.5% ETEC/EAEC/EIEC.	[20]
Peru	In 3,284 <i>E. coli</i> strains isolated from pediatric patients in eight previous studies atypical EPEC (54/74, 73%) was the most frequent pathotype.	[21]
Venezuela	The frequency of diarrheagenic <i>E. coli</i> is 18.9%, with EPEC being the most frequently isolated pathotype, followed by ETEC and EIEC, while EAEC strains are in last place.	[7]
Costa Rica	The prevalence of diarrheagenic <i>E. coli</i> is 8.4% corresponding to EPEC.	[21]
Mexico	The frequency of diarrheagenic strains was 23%; EAEC was the most commonly isolated category, followed by EPEC and ETEC (12.2%, 5.1% and 4.3%, respectively).	[22]

STEC: Shiga toxin-producing *E. coli*; ETEC: enterotoxigenic *E. coli*; EAEC: enteroaggregative *E. coli*; EPEC: enteropathogenic *E. coli*; EIEC: enteroinvasive *E. coli*; STEC: Shiga toxin-producing *E. coli*.

***E. coli* genome and genetic plasticity**

The complete genome of *E. coli* ranges from 4.6 to 5.9 million base pairs and contains 4,200 to 5,500 genes. The enormous plasticity of its genome has allowed it to adapt to diverse ecological niches, the intestinal environment, and extraintestinal body sites, reflecting the great genetic diversity within the species and causing a wide spectrum of diseases. Unlike other organisms, *E. coli* has mechanisms to improve its gene pool, such as a) changes in the nucleotide sequence of the genome (mutations), b) genome remodeling through recombination, and c) acquisition of exogenous genes through horizontal gene transfer (HGT). In addition, it is estimated that 10–16% of the *E. coli* chromosome arose through HGT events, greatly facilitating its genetic flexibility and providing accessory genetic elements, such as those for antibiotic resistance or VFs [27, 28].

Due to the ability that *E. coli* possesses to exchange genetic material with other bacterial species, it has become an ideal candidate for the study of resistance gene reservoirs in distinct niches [3]. Most *E. coli* strains enter environments and ecosystems through anthropogenic activities, discharge from livestock and poultry production, hospital and municipal wastewater, or direct contact with livestock, poultry, food-producing animals, and this consequently facilitates the transfer of resistance from non-pathogenic to pathogenic strains in the same environment [4, 5], which makes community and sanitary infections caused by *E. coli* of greater concern and importance than toxigenic and diarrheal strains with high mortalities in various populations around the world [3].

Study of the easy adaptation, environmental changes, and genomic diversity that characterize *E. coli* requires the analysis of its genetic environment and the MGEs associated with VFs and antibiotic resistance genes, which could provide helpful information at the epidemiological and medical levels [4].

DISCUSSION

Antimicrobial resistance in E. coli isolated from food in Mexico and Latin America

In recent years, interest in antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from food in Mexico and Latin America has increased not only because of the presence of pathogenic *E. coli* in food but also because of commensal strains with multidrug resistance worldwide. These commensal strains can act as reservoirs of resistance genes that can be shared with other resident or pathogenic microorganisms in mixed infections and contribute to treatment failure, highlighting the need to implement monitoring and control strategies for these threats [7, 29].

The high frequency of antibiotic-resistant *E. coli* in food, clinical, community, and environmental settings worldwide has been mainly attributed to the excessive and inappropriate use of antibiotics in human and veterinary medicine. Despite the strategies implemented for the prudent use of antimicrobials, both in livestock production and in the clinical area, for many years, the percentages of MDR bacteria have remained high, representing a constant therapeutic challenge [3, 30, 31]. Furthermore, the appearance of MDR *E. coli* with high virulence potential is alarming given the risk it represents for human health through the food chain. The increasing evidence of antibiotic resistance genes in diarrheagenic strains (Supplementary Table 2) [32–38] and ExPEC has seriously complicated the treatment of

infections, since the presence of resistance genes in MGEs increases the possibility of spreading antibiotic resistance among STEC bacteria and other bacteria associated with foodborne diseases but also minimizes the possible therapeutic options for human infections [39, 40]. In Mexico, a high rate of resistance to quinolones has been observed in clinical, environmental, diarrheagenic, and pediatric isolates. Multidrug resistance has even been found in UPEC; however, the lack of sufficient data on the virulence spectrum and isolates from community and hospital infections makes infection control and management difficult [16]. Even so, unlike reports on clinical isolates and although the global incidences of foodborne diseases are high, there are few studies on food in Mexico and Latin America, which demonstrates the importance of generating updated data in order to provide useful information to maximize the potential impact of food-borne infections.

Mechanisms of antibiotic resistance in E. coli

Pathogenic strains of *E. coli* can harbor VFs and antibiotic resistance genes in the same MGEs facilitating their dissemination among isolates, as well as commensal strains that promote the evolution of resistance to different antibiotic families and eventually act as a gene reservoir conferring a high prevalence of resistance genes among foodborne zoonotic pathogens [30, 39, 40]. Pathogenic strains recovered from food and cases of diarrhea and food poisoning come to possess high rates of resistance to groups of commonly used antibiotics, such as quinolones, aminoglycosides, macrolides, cephalosporins, sulfonamides, fluoroquinolones, and tetracycline, with the genes *qnr*, *dfrA1*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-M}*, *tetA*, *tetB*, *aac (6)-Ib*, *sul*, *cat-1*, *cmlA*, and *aadA1* being the most commonly found in diarrheagenic strains, food, water, and some livestock animals, which is why resistance to antibiotics used in animals can be transmissible to humans through contact with or consumption of animal products [32–36].

In Latin America, resistance to beta-lactams is the most reported resistance mechanism, followed by resistance to quinolones [41]. Several studies have shown the presence of ESBL-producing *E. coli* in food sources such as meat and dairy products [38], as well as β -lactamase AmpC in beef and pork [33, 34]. Although the most commonly found beta-lactamases in *E. coli* are TEM, SHV, CTX-M, OXA, and NDM [42], studies in Latin America show a high persistence of the *bla_{TEM-1}* gene in diarrheagenic strains (Supplementary Table 2). However, genes such as *bla_{CMY2}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{TEM-1}* have been identified in strains isolated from meat for human consumption and the feces of animals and encoded in different mobilizable genetic elements (Tables 3 and 4) [34, 43–62]. As mentioned above, resistance to quinolones is the second most reported resistance mechanism in Latin America, with *aac(6)-Ib-cr* and *qnr* genes being the most frequently found [41]. However, genes belonging to the chromosomal resistance mechanism, such as *gyrA* and *parC* [36], have also been identified in diarrheagenic strains isolated from meat or animals (Supplementary Table 2 and Table 3).

Mechanisms of resistance to antibiotics of last therapeutic resort

Other resistance mechanisms that have been described in *E. coli* isolates include resistance to fosfomicin caused by mutations in genes of the *glpT* or *uhpA/T* transporters [42] and by the inactivation of fosfomicin by fosfomicin-modifying

Table 3. Plasmids related to antimicrobial resistance of *E. coli* reported in Latin American countries

Plasmid	Gene that disseminates	Sample origin	Study country	References
IncF	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-1-like} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>aadA</i> , <i>cmlA</i> , <i>qepA</i> , <i>dfr2</i>	Pig feces and soil	Brazil	[43, 44]
		Human	Argentina	
IncFII	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{NDM-1}	Human	Mexico	[45]
IncX1	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>sul3</i> , <i>qnrB</i> , <i>dfrA12</i> , <i>cmlA1</i>	Poultry cloacal swabs	Cuba	[46]
IncFIA	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-1-like} , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>aadA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>floR</i> , <i>cmlA</i>	Pig feces and soil	Brazil	[44, 47]
		Clinical isolate	Mexico	
IncFIB	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>mcr-1</i> , <i>floR</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA5</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>cat</i> , <i>qnr</i> , <i>dfrA</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-12}	Clinical isolate	Colombia	[47, 48]
		Clinical isolate	Mexico	
IncI1	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1}	Clinical isolate	Uruguay	[43, 49]
		Chicken, beef and pork meat	Brazil	
IncR	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>qnrS</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA14</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>strB</i>	Poultry cloacal swabs	Cuba	[46]
IncI2	<i>mcr-1.5</i>	Human	Argentina	[43]
IncHI2	<i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>sul1</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>qnrB</i> , <i>dfrA12</i> , <i>gyrA</i> , <i>parC</i>	Chicken meat	Brazil	[43, 46]
		Poultry cloacal swabs	Cuba	
IncX2	<i>qnrB19</i> , <i>tetA</i>	Chicken	Paraguay	[50]
IncA / C	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{NDM-1}	Cattle, pig, turkey, human,	Chile	[43, 51]
		horse	Honduras	
			Colombia	
IncN	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-1-like} , <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>qnrB10</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i>	Pig feces and soil	Brazil	[43, 44]
		Human	Argentina	
IncX4	<i>mcr-1</i>	Chicken meat	Brazil	[52]
		Human		
		Food		
ColE-Like	<i>qnrB19</i>	Human	Peru	[43]
			Bolivia	

enzymes such as FosA, FosB, FosC, or FosL. The *fosA* gene and its different subtypes have been found to be associated with plasmids in strains of *E. coli* and the Enterobacteriaceae family, with the *fosA* gene being the most commonly found in human and food-producing animal isolates [63].

In addition to fosfomycin resistance, the clinical efficacy of colistin, an antibiotic used as a last resort in the treatment of multidrug-resistant infections, was compromised by the emergence of the plasmid-mediated gene family expressing colistin resistance, comprising the *mcr-1* to *mcr-9* genes, in the last 4 years [64]. The most worrying characteristics of the *mcr* genes are their localization in transferable plasmids, because these plasmids facilitate their dissemination by conjugation between different bacterial species, and their constant co-localization with genes encoding ESBL and plasmid AmpC [48, 65]. Currently, the *mcr-1* gene has been identified in *E. coli* isolates in humans and in various foods of animal origin, including meat from chickens, pigs, piglets, cattle, calves, and turkeys [42].

In Latin America, the *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* genes have been reported in strains isolated from animals, food, and humans, in contrast to other countries, with the *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* genes having been reported in Asian and European countries and the *mcr-9* gene having been reported in the USA [66].

Genetic elements involved in the mobilization of resistance genes

As mentioned above, HGT involves the mobilization of genetic elements between bacteria in response to the stress of rapid bacterial adaptation. HGT is one of the main mechanisms responsible for the acquisition of resistance genes and an important

factor in bacterial evolution. Elements such as transposons and integrons are involved in intracellular mobility between chromosomes and replicons, while plasmids, bacteriophages, or integrative conjugative elements (ICE) are involved in intercellular gene exchange. According to Latin American reports, plasmids, integrons, transposons, and insertion sequences (ISs) are the main genetic mobilization elements observed in *E. coli* (Tables 3 and 4). Studies done in other non-Latin American countries (mainly European) also show a wide distribution of resistance determinants in foodborne *E. coli* around the world (Supplementary Table 3) [3, 4, 50, 53, 63, 65, 67–93].

Plasmids

With a determinant role in the dissemination of antibiotic resistance, plasmids have the capacity to be transmitted horizontally in an autonomous way or can be mobilized. Besides being dispensable when they no longer possess genes indispensable for their host, plasmids that confer multi-resistance are normally large (>50 Kb) and conjugative and possess mechanisms that control the number of plasmid copies, regulating their replication rate [43]. The identification of plasmid characteristics provides important knowledge for understanding the contribution and acquisition of new resistance genes through MGEs as well as their ability to replicate in a wide range of hosts, making them perfect vectors for the propagation of MDR bacteria. Currently, *E. coli* strains carrying multidrug resistance plasmids are one of the most critical and worrisome antibiotic resistance problems, as they encode resistance to β -lactams, quinolones, aminoglycosides, tetracyclines, sulfonamides, and many other classes of drugs, causing ineffective treatments [28].

Table 4. Integrons, transposons, and insertion sequences associated to antimicrobial resistance genes in *E. coli* reported in Latin American countries

Genetic element	Rearrangement of genes that disseminate	Sample origin	Study country	References
Integrons				
Class 1 and 2	<i>aacA4-catB3-dfrA1, aadA1, dfrA1, aadB, aacC, dfrA17</i>	Chicken Clinical isolate	Mexico	[53, 54]
Class 1 and 2	<i>dfrA12-orfF-aadA28, dfrA17-aadA5, dfrA29, aadA7, aadA29, dfrA12-orfF-aadA2-cmlA-aadA1, dfrA1-sat2-aadA30</i>	Canine isolates	Brazil	[55]
Class 1 and 2	<i>cat1, dfrA1, bla_{TEM-1}, tetA, tetB, aac(6)-Ib</i>	Cattle and swine	Chile	[34]
Class 1	<i>dfrA17, aadA5, sul1, sul2, sul3</i>	Clinical isolate	Uruguay	[56]
Class 1	<i>aadA1b, aadA2, aadA11cΔ, dfrB3-aadA1di-catB2-aadA6k</i>	Biopurification	Argentina	[53]
Transposons				
Tn6242	<i>sul1, mphA, mphR</i>	Clinical isolate	Mexico	[47]
Tn6652	<i>bla_{CTX-M-14}, bla_{TEM-1}</i>	Clinical isolate	Uruguay	[49]
Tn5387	<i>qnrB19</i>	Human	Peru	[43]
Tn3000	<i>bla_{NDM-1}</i>	ND	Brazil	[51]
Tn4401	<i>bla_{KPC}</i>	Clinical isolate	Argentina, Chile Brazil	[51, 57, 58]
Tn125 and Tn5393	<i>bla_{NDM-1}</i>	ND	Colombia	[51]
Tn3	<i>mcr-5.3</i>	Horse	Brazil	[59]
Insertion sequences				
IS _{Apl1} -IS30	<i>mcr-1</i>	Clinical isolate Wild Animal Production Animals Human	Colombia Argentina Mexico Bolivia	[60]
IS1	ND	Human	Argentina Colombia	[61]
IS26	ND <i>bla_{CTX-M-8}, bla_{CTX-M-15}</i>	Human Public wastewater treatment plants	Argentina Brazil	[61, 62]
ISE _{cp1} -IS10	<i>bla_{CTX-M-14}</i>	Clinical isolate	Uruguay	[49]

ND: Not described.

Among the most frequently reported plasmids in *E. coli* of food origin are IncFII, IncFIB, and IncI1 isolated from animals for human consumption, such as chickens and pigs [94]. However, studies in Latin America have reported a great diversity of plasmid groups, such as IncI1, IncFIB, IncFIA, IncFIC, IncHI2, IncQ1, IncFII, IncN, IncR, IncX1, IncX4, IncA/C, IncK, IncP, IncH11, IncI2, IncCoIE, and IncY, isolated from food, production animals, pork, chicken meat, and raw vegetables [52, 63].

Integrons

Gene dissemination can also be regulated by integrons capable of integrating and expressing antibiotic resistance genes. Due to variations in the amino acid sequences of their integrases, there are five classes of “mobile” integrons associated with antibiotic resistance: class 1, class 2, class 3, class 4, and class 5 integrons [95]. Class 1 and 2 integrons are frequently detected and well characterized among bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family, including *E. coli*, with the first three classes of integrons being the most involved in the acquisition of the MDR phenotype [96]. Class 1 and 2 integrons have been found in plasmids and transposons, and class 3 integrons have only been found in plasmids and have generally been recovered from clinical contexts; on the other hand, class 4 integrons, or “superintegrons”, and class 5 integrons have minor roles in antibiotic resistance [95].

Studies in different countries around the world have found the presence of integrons in foods such as raw meats, seafood products, fresh vegetables, and fresh fruits, indicating the presence of class 1 integrons as one of the most abundant in strains of *E. coli* isolated from food products. Class 1 and 2 integrons have been identified in research in the livestock sector and on poultry farms, and class 1, 2, and 3 integrons have been identified in poultry, fruits and vegetables, with the *dfrA1* and *aadA1* genes being the most reported in food products [53].

In Latin America, class 1 and 2 integrons have been reported (Table 4) with various origins. In Mexico, food of animal origin and fecal samples from domestic animals, humans, and wild animals have been shown to be potential sources of class 1 and 2 integrons [53, 97–99]. In Argentina, class 1 integrons have been identified in STEC strains isolated from food, animals, and the agricultural environment [32], and in Chile, class 1 and 2 integrons have been identified in strains of porcine origin [34].

Transposons

Just as plasmids play an important role in the mobilization of genes between cells, transposons, or “jumping genes”, are one of the main mobile elements of dissemination due to their ability to change position within a genome and cause insertional mutations, duplications, and rearrangements in the genome [95].

Because of their self-recombination system, transposons can transfer from one plasmid to other plasmids or from a DNA

chromosome to a plasmid and vice versa, causing great variability and giving them the ability to efficiently spread resistance/virulence genes between species, regardless of their level of genetic relatedness [28, 84].

Although most of the reported transposons are of clinical origin, their incidence and spread are potentially dangerous for future or current transmission in food, and this has not yet been sufficiently studied.

Insertion sequences

The insertion sequences are the simplest transposon elements found in prokaryotes, capable of being transposed independently in an organism [90], and play an important role in the evolution and dissemination of antimicrobial resistance genes [60]. However, like transposons, they can be found in chromosomes or plasmids, in addition to having complete or partial promoters, which are frequently located at the ends, allowing them to increase the expression of neighboring genes [51].

The precise search for these elements in different countries showed with greater frequency sequences such as IS26 and ISEcp1 in both Latin American and non-Latin American countries (Table 4 and Supplementary Table 3), related to different origins, but being significant for the prevalence and perspectives formed in each study, giving greater openness to the investigation of elements related to IS, and genes involved with these.

E. coli is one of the bacteria most commonly associated with foodborne diseases due to the ease of contamination of food when harvested or handled under minimal hygienic conditions, as well as the intrinsic capacity of the bacterium to persist and acquire virulence determinants that allow it to cause damage to susceptible hosts. In addition, it has been shown that *E. coli* pathotypes present high rates of resistance to antibiotics, which limits the therapeutic options to treat infections. In this review, studies reported in the last six years were analyzed to investigate the participation of *E. coli* in the development of foodborne diseases in Mexico and Latin America. Furthermore, this review concentrated on the contents of genes involved in resistance to different families of antibiotics used in the clinic, with special emphasis on describing those harbored in MGEs such as plasmids, integrons, transposons, and insertion sequences, which facilitate the dissemination of genes among strains of *E. coli* and other enterobacteria.

Although the global incidence of foodborne diseases is high, few studies have been carried out in Mexico and Latin America, highlighting the need to generate updated and comprehensive epidemiological data with a “One Health” approach to monitor the phenomenon of resistance in *E. coli* from a common perspective in the interaction of human, veterinary, and environmental health in order to provide more information and minimize the impacts of foodborne infections caused by MDR *E. coli*. Finally, it is hoped that this literature review will contribute to a better understanding of the current situation regarding the prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* strains in food and their potential risk to human, veterinary, and environmental health.

FUNDING

This work was supported by the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) [Grant: CB-2017-2018/A1-S-22136]. The CONAHCYT also provided

a fellowship [822131 to LBO], and funding source through the Sistema Nacional de Investigadores [87723 to RCRG and 335026 to GCC].

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Pepper St. Clair and Sage Chavez from the Department of Biology and Chemistry at California State University Monterey Bay for native English editing.

REFERENCES

- Soto Z, Pérez L, Estrada D. 2016. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte* 32: 105–122.
- Zuñiga I, Caro J. 2017. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades Infecc y Microbiol* 37: 95–104.
- Mbelle NM, Feldman C, Osei Sekyere J, Maningi NE, Modipane L, Essack SY. 2019. The resistome, mobilome, virulome and phylogenomics of multidrug-Resistant *Escherichia coli* clinical isolates from Pretoria, South Africa. *Sci Rep* 9: 16457. [Medline] [CrossRef]
- Singh NS, Singhal N, Virdi JS. 2018. Genetic environment of *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CMY-42} and characterization of integrons of *Escherichia coli* isolated from an Indian urban aquatic environment. *Front Microbiol* 9: 1–8. [CrossRef]
- Tabaran A, Soulageon V, Chirila F, Reget OL, Mihaiu M, Borzan M, Dan SD. 2022. Pathogenic *E. coli* from cattle as a reservoir of resistance genes to various groups of antibiotics. *Antibiotics (Basel)* 11: 1–8. [Medline]
- Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol* 199: 811–825. [Medline] [CrossRef]
- Canata MG, Navarro R, Velázquez G, Rivelli S, Rodríguez F, Céspedes A, Espinola C, Canese J, Guillén R. 2016. Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in 2012. *Pediatría (Asunción)* 43: 13–17. [CrossRef]
- de la Rosa-Hernández MC, Cadena-Ramírez A, Téllez-Jurado A, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Chávez-Urbiola EA, Castro-Rosas J. 2018. Presence of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli*, and enterotoxigenic *Escherichia coli* on fresh cheeses from local retail markets in Mexico. *J Food Prot* 81: 1748–1754. [Medline] [CrossRef]
- OMS. 2018. *E. coli*. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> (accessed 2022-05-12).
- Chervy M, Barnich N, Denizot J. 2020. Adherent-invasive *E. coli*: Update on the lifestyle of a troublemaker in Crohn's disease. *Int J Mol Sci* 21: 1–34. [Medline] [CrossRef]
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel JF. 2018. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 67: 574–587. [Medline] [CrossRef]
- Lindstedt BA, Finton MD, Porcellato D, Brandal LT. 2018. High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples. *BMC Infect Dis* 18: 544. [Medline] [CrossRef]
- Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R 3rd, Mellata M. 2015. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol* 81: 1177–1187. [Medline] [CrossRef]
- Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmieciak A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog* 11: 10. [Medline] [CrossRef]
- Hayashi W, Tanaka H, Taniguchi Y, Iimura M, Soga E, Kubo R, Matsuo N, Kawamura K, Arakawa Y, Nagano Y, Nagano N. 2019. Acquisition of *mcr-1* and cocarriage of virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from municipal wastewater influents in Japan. *Appl Environ Microbiol* 85: 1–11. [Medline] [CrossRef]
- Ramírez-Castillo FY, Moreno-Flores AC, Avelar-González FJ, Márquez-Díaz F, Harel J, Guerrero-Barrera AL. 2018. An evaluation of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 17: 34. [Medline] [CrossRef]
- Secretaría de Salud. 2023. Boletín epidemiológico sistema nacional de vigilancia

- epidemiológica sistema único de información. Available at: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-261547> (accessed 2023-03-06)
18. Bonten MJM, Utrecht UMC. 2019. Study to collect information about invasive disease caused by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*-2 (EXPECT-2). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04117113> (accessed 2022-05-13)
 19. Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina IV. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil infectología* 33: 438–450. [CrossRef]
 20. Weiler N, Orrego M, Alvarez M, Huber C. 2017. Molecular detection of diarrheogenic *Escherichia coli* in pediatric patients with acute diarrheal syndrome in Paraguay. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud* 15: 16–21. [CrossRef]
 21. Roque M. 2017. Frecuencia de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de niños en un hospital pediátrico en Lima-Perú. *Cienc Invest* 20: 23–28.
 22. Canizalez-Roman A, Flores-Villaseñor HM, Gonzalez-Nuñez E, Velazquez-Roman J, Vidal JE, Muro-Amador S, Alapizco-Castro G, Diaz-Quiñonez JA, León-Sicarios N. 2016. Surveillance of diarrheogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrhea cases from children, adults and elderly at northwest of Mexico. *Front Microbiol* 7: 1924. [Medline] [CrossRef]
 23. Molina NB, Odeiz S, Vescina C, Córdoba A, Basualdo JÁ, Sparo MD. 2022. [First report of diarrheogenic *Escherichia coli* in pediatric outpatient population with diarrhea in La Plata, Argentina]. *Rev Argent Microbiol* 54: 15–21 [in Spanish]. [Medline]
 24. Global STD. 2017. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Available at: <https://www.globalstd.com/blog/enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta/> (accessed 2022-06-02)
 25. Salas-Rosas LM, López CA, Sánchez-Cervantes A, Vázquez-Peláez CG, Rodríguez-Torres A, Cervantes-Chávez JA, Olvera-Ramírez AM. 2020. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 in a red deer herd (*Cervus elaphus scoticus*) in central Mexico. *Appl Anim Sci* 36: 622–629. [CrossRef]
 26. Rios-Muñiz D, Cerna-Cortés JF, Morán-García N, Meza-Segura M, Estrada-García T. 2019. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos muridos. *Gac Med Mex* 155: 410–416. [Medline]
 27. Porse A, Gumpert H, Kubicek-Sutherland JZ, Karami N, Adlerberth I, Wold AE, Andersson DI, Sommer MOA. 2017. Genome dynamics of *Escherichia coli* during antibiotic treatment: transfer, loss, and persistence of genetic elements in situ of the infant gut. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 126. [Medline] [CrossRef]
 28. von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol* 7: 173. [Medline] [CrossRef]
 29. Amarillas I, Rubi-Rangel I, Chaidez C, González-Robles A, Lightbourn-Rojas L, León-Félix J. 2017. Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 8: 1355. [Medline] [CrossRef]
 30. Carvalho I, Chenouf NS, Cunha R, Martins C, Pimenta P, Pereira AR, Martínez-Álvarez S, Ramos S, Silva V, Igrejas G, Torres C, Poeta P. 2021. Antimicrobial resistance genes and diversity of clones among ESBL- and acquired AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy and sick cats in Portugal. *Antibiotics* (Basel) 10: 1–12.
 31. Gambi L, Crippa C, Lucchi A, De Cesare A, Parisi A, Manfreda G, Pasquali F. 2022. Research note: The resistome of commensal *Escherichia coli* isolated from broiler carcasses “produced without the use of antibiotics”. *Poult Sci* 101: 101770. [Medline] [CrossRef]
 32. Colello R, Krüger A, Conza JD, Rossen JWA, Friedrich AW, Gutkind G, Etcheverría AI, Padola NL. 2018. Antimicrobial resistance in class 1 integron-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, pigs, food and farm environment. *Microorganisms* 6: 1–8. [Medline] [CrossRef]
 33. Galarce N, Sánchez F, Escobar B, Lapierre L, Cornejo J, Alegria-Morán R, Neira V, Martínez V, Johnson T, Fuentes-Castillo D, Sano E, Lincopan N. 2021. Genomic epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the livestock-food-human interface in South America. *Animals* (Basel) 11: 1–17. [Medline]
 34. Galarce N, Sánchez F, Fuenzalida V, Ramos R, Escobar B, Lapierre L, Paredes-Osses E, Arriagada G, Alegria-Morán R, Lincopan N, Fuentes-Castillo D, Vera-Leiva A, González-Rocha G, Bello-Toledo H, Boric C. 2020. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and swine in Chile. *Front Vet Sci* 7: 367. [Medline] [CrossRef]
 35. Quino W, Mestanza O, Caro-Castro J, Hurtado CV, Gavilán RG. 2020. Resistome and comparative genomics of clinical isolates of diarrheogenic *Escherichia coli* from Lima, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 37: 705–710. [Medline] [CrossRef]
 36. Guiral E, Gonçalves Quiles M, Muñoz L, Moreno-Morales J, Alejo-Cancho I, Salvador P, Alvarez-Martinez MJ, Marco F, Vila J. 2019. Emergence of resistance to quinolones and β -lactam antibiotics in enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveler’s diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 63: 1–9. [Medline] [CrossRef]
 37. De Frutos M, Ramiro R, Pereña JJ, Sánchez S. 2020. Mixed infection of four diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes in a case of travellers’ diarrhoea: characterisation of the isolates by whole-genome sequencing. *Enferm Infect Microbiol Clin* (Engl Ed) 38: 39–40 [in Spanish]. [Medline] [CrossRef]
 38. Parussolo I, Sfaciotte RAP, Dalmina KA, Melo FD, Da Costa UM, Ferraz SM. 2019. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. *Semin Agrar* 40: 163–178. [CrossRef]
 39. Markland SM, LeStrange KJ, Sharma M, Kniel KE. 2015. Old Friends in new places: exploring the role of extraintestinal *E. coli* in intestinal disease and foodborne illness. *Zoonoses Public Health* 62: 491–496. [Medline] [CrossRef]
 40. Mir RA, Kudva IT. 2019. Antibiotic-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview of prevalence and intervention strategies. *Zoonoses Public Health* 66: 1–13. [Medline] [CrossRef]
 41. Peñalosa LM, Aspiazú KA. 2021. Mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* en América Latina. *Rev Vive* 4: 203–216. [CrossRef]
 42. Poirel L, Maded JY, Lupo A, Schink K, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6: 1–27. [Medline] [CrossRef]
 43. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ, Hordijk J. 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 73: 1121–1137. [Medline] [CrossRef]
 44. Furlan JPR, da Silva Ferreira ME, Stehling EG. 2020. Genetic diversity of multidrug-resistant CMY-producing *Escherichia coli* from feces and soil in a small-scale pig farm. *Microb Drug Resist* 26: 1365–1371. [Medline] [CrossRef]
 45. Torres-González P, Bobadilla-Del Valle M, Tovar-Calderón E, Leal-Vega F, Hernández-Cruz A, Martínez-Gamboa A, Niembro-Ortega MD, Sifuentes-Osorio J, Ponce-de-León A. 2015. Outbreak caused by *Enterobacteriaceae* harboring NDM-1 metallo- β -lactamase carried in an IncFII plasmid in a tertiary care hospital in Mexico City. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 7080–7083. [Medline] [CrossRef]
 46. Baez M, Espinosa I, Collaud A, Miranda I, Montano DLN, Feria AL, Hernández-Fillor RF, Obregón D, Alfonso P, Perreten V. 2021. Genetic features of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in mayabeque province, Cuba. *Antibiotics* (Basel) 10: 1–14. [Medline]
 47. Barrios-Camacho II, Duran-Bedolla J, Silva-Sanchez J, Lozano-Aguirre L, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Graza-Ramos U. 2021. Genetic characterization of plasmid-mediated *qepA* gene among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in Mexico. *Res Sq* 1–7. Available at: [CrossRef] (accessed 2022-06-17).
 48. Saavedra SY, Diaz L, Wiesner M, Correa A, Arévalo SA, Reyes J, Hidalgo AM, de la Cadena E, Perenguez M, Montaño LA, Ardila J, Ríos R, Ovalle MV, Diaz P, Porras P, Villegas MV, Arias CA, Beltrán M, Duarte C. 2017. Genomic and molecular characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* harboring *mcr-1* in Colombia, 2002 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* 61: 1–13. [Medline] [CrossRef]
 49. Di Pilato V, Papa-Ezdra R, Chiarelli A, Garcia-Fulgueiras V, Pallecchi L, Vignoli R. 2019. Characterization of the first bla_{CTX-M-15}/ermB-carrying IncI plasmid from Latin America. *Plasmid* 102: 1–5. [Medline] [CrossRef]
 50. Dobiasova H, Dolejska M. 2016. Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying fluoroquinolone and β -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from diverse sources and geographical areas. *J Antimicrob Chemother* 71: 2118–2124. [Medline] [CrossRef]
 51. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. 2020. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Braz J Infect Dis* 24: 231–238. [Medline] [CrossRef]
 52. Mendes Oliveira VR, Paiva MC, Lima WG. 2019. Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Travel Med Infect Dis* 31: 101459. [Medline] [CrossRef]
 53. Zhang S, Abbas M, Rehman MU, Huang Y, Zhou R, Gong S, Yang H, Chen S, Wang M, Cheng A. 2020. Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in *Escherichia coli*: a risk to human health. *Environ Pollut* 266: 115260. [Medline] [CrossRef]
 54. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cázares-Domínguez V, Escalona G, Sepúlveda-González ME, López-Montiel F, Arellano-Galindo J, López-Martínez B, Parra-Ortega I, Giono-Cerezo S, Hernández-Castro R, de la Rosa-Zamboni D, Xicohtencatl-Cortes J. 2016. Multidrug- and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Front Microbiol* 7: 2042. [Medline] [CrossRef]
 55. Siqueira AK, Michael GB, Domingos DF, Ferraz MMG, Ribeiro MG, Schwarz S, Leite DS. 2016. Diversity of class 1 and 2 integrons detected in *Escherichia coli* isolates from diseased and apparently healthy dogs. *Vet Microbiol* 194: 79–83. [Medline] [CrossRef]
 56. Poey ME, Laviña M. 2018. Horizontal transfer of class 1 integrons from uropathogenic *Escherichia coli* to *E. coli* K12. *Microb Pathog* 117: 16–22. [Medline] [CrossRef]
 57. Vera-Leiva A, Barria-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, Bello-Toledo H, González-Rocha G. 2017. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Rev Chilena Infectol* 34: 476–484. [Medline] [CrossRef]
 58. De Belder D, Lucero C, Rapoport M, Rosato A, Faccone D, Petroni A, Pasteran F, Albornoz E, Corso A, Gomez SA. 2018. Genetic diversity of KPC-producing

- Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* isolates from Argentina. *Microb Drug Resist* 24: 958–965. [Medline] [CrossRef]
59. Fernandes MR, Cerdeira L, Silva MM, Sellera FP, Muñoz M, Junior FG, Azevedo SS, Power P, Gutkind G, Lincopan N. 2018. Novel *mer-5.3* variant in a CTX-M-8-producing *Escherichia coli* ST711 isolated from an infected horse. *J Antimicrob Chemother* 73: 3520–3522. [Medline]
 60. Lentz SAM, Dalmolin TV, Barth AL, Martins AF. 2021. *mcr-1* gene in Latin America: how is it disseminated among humans, animals, and the environment? *Front Public Health* 9: 648940. [Medline] [CrossRef]
 61. Reid CJ, McKinnon J, Djordjevic SP. 2019. Clonal ST131-H22 *Escherichia coli* strains from a healthy pig and a human urinary tract infection carry highly similar resistance and virulence plasmids. *Microb Genom* 5: 1–12. [Medline]
 62. Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, da Silva QM, Matté GR, Sato MIZ, Matté MH. 2016. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 4953–4958. [Medline] [CrossRef]
 63. Huang Y, Lin Q, Zhou Q, Lv L, Wan M, Gao X, Wang C, Liu JH. 2020. Identification of *fosA10*, a novel plasmid-mediated fosfomycin resistance gene of *Klebsiella pneumoniae* origin, in *Escherichia coli*. *Infect Drug Resist* 13: 1273–1279. [Medline] [CrossRef]
 64. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. 2020. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother* 75: 3087–3095. [Medline] [CrossRef]
 65. Ragupathi NKD, Bakthavatchalam YD, Mathur P, Pragasam AK, Walia K, Ohri VC, Veeraraghavan B. 2019. Plasmid profiles among some ESKAPE pathogens in a tertiary care centre in south India. *Indian J Med Res* 149: 222–231. [Medline] [CrossRef]
 66. Elbediwi M, Li Y, Paudyal N, Pan H, Li X, Xie S, Rajkovic A, Feng Y, Fang W, Rankin SC, Yue M. 2019. Global burden of colistin-resistant bacteria: mobilized colistin resistance genes study (1980–2018). *Microorganisms* 7: 1–18. [Medline] [CrossRef]
 67. Belotindos LP, Tsunoda R, Villanueva MA, Nakajima C, Mingala CN, Suzuki Y. 2022. Characterisation of plasmids harbouring *qnrA1*, *qnrS1*, and *qnrB4* in *E. coli* isolated in the Philippines from food-producing animals and their products. *J Glob Antimicrob Resist* 30: 38–46. [Medline] [CrossRef]
 68. Dunn SJ, Connor C, McNally A. 2019. The evolution and transmission of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: the complexity of clones and plasmids. *Curr Opin Microbiol* 51: 51–56. [Medline] [CrossRef]
 69. Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Temba S, Kipasika H, Smith W, Call DR. 2016. IncF plasmids are commonly carried by antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in northern Tanzania. *Int J Microbiol* 2016: 3103672. [Medline] [CrossRef]
 70. Yang QE, Sun J, Li L, Deng H, Liu BT, Fang LX, Liao XP, Liu YH. 2015. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front Microbiol* 6: 964. [Medline] [CrossRef]
 71. Devanga Ragupathi NK, Muthuirulandi Sethuvel DP, Gajendiran R, Daniel JJK, Walia K, Veeraraghavan B. 2017. First Indian report of IncX3 plasmid carrying *bla_{NDM-7}* in *Escherichia coli* from bloodstream infection: potential for rapid dissemination. *New Microbes New Infect* 17: 65–68. [Medline] [CrossRef]
 72. Jeong S, Kim JO, Yoon EJ, Bae IK, Lee W, Lee H, Park Y, Lee K, Jeong SH. 2018. Extensively drug-resistant *Escherichia coli* sequence type 1642 carrying an IncX3 plasmid containing the *bla_{KPC-2}* Gene associated with transposon Tn4401a. *Ann Lab Med* 38: 17–22. [Medline] [CrossRef]
 73. Pitart C, Solé M, Roca I, Román A, Moreno A, Vila J, Marco F. 2015. Molecular characterization of *bla_{NDM-5}* carried on an IncFII plasmid in an *Escherichia coli* isolate from a nontraveler patient in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 659–662. [Medline] [CrossRef]
 74. Alousi S, Salloum T, Arabaghian H, Matar GM, Araj GF, Tokajian ST. 2018. Genomic characterization of MDR *Escherichia coli* harboring *bla_{OXA-48}* on the IncL/M-type plasmid isolated from blood stream infection. *BioMed Res Int* 2018: 3036143. [Medline] [CrossRef]
 75. Tyson GH, Li C, Hsu CH, Bodeis-Jones S, McDermott PF. 2019. Diverse fluoroquinolone resistance plasmids from retail meat *E. coli* in the United States. *Front Microbiol* 10: 2826. [Medline] [CrossRef]
 76. Fang L, Li X, Li L, Li S, Liao X, Sun J, Liu Y. 2016. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Sci Rep* 6: 25312. [Medline] [CrossRef]
 77. Sun YW, Liu YY, Wu H, Wang LF, Liu JH, Yuan L, Pan YS, He DD, Hu GZ. 2019. IS26-flanked composite transposon Tn6539 carrying the *tet(M)* gene in IncII2-type conjugative plasmids from *Escherichia coli* isolated from ducks in China. *Front Microbiol* 9: 3168. [Medline] [CrossRef]
 78. Harmer CJ, Hall RM. 2015. The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* 80: 63–82. [Medline] [CrossRef]
 79. Kotlarska E, Luczkiewicz A, Pisowacka M, Burzyński A. 2015. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environ Sci Pollut Res Int* 22: 2018–2030. [Medline] [CrossRef]
 80. Sunde M, Simonsen GS, Slettebø JS, Bøckerman I, Norström M. 2015. Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs. *PLoS One* 10: e0128797. [Medline] [CrossRef]
 81. Kheiri R, Akhtari L. 2016. Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. *Gut Pathog* 8: 40. [Medline] [CrossRef]
 82. Wyrsh ER, Roy Chowdhury P, Chapman TA, Charles IG, Hammond JM, Djordjevic SP. 2016. Genomic microbial epidemiology is needed to comprehend the global problem of antibiotic resistance and to improve pathogen diagnosis. *Front Microbiol* 7: 843. [Medline] [CrossRef]
 83. Cho S, Nguyen HAT, McDonald JM, Woodley TA, Hiott LM, Barrett JB, Jackson CR, Frye JG. 2019. Genetic characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from a mixed-use watershed in northeast Georgia, USA. *Int J Environ Res Public Health* 16: 1–14. [Medline] [CrossRef]
 84. Babakhani S, Oloomi M. 2018. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol* 58: 905–917. [Medline] [CrossRef]
 85. McKinnon J, Roy Chowdhury P, Djordjevic SP. 2018. Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST58 causing urosepsis. *Int J Antimicrob Agents* 52: 430–435. [Medline] [CrossRef]
 86. Chowdhury PR, McKinnon J, Liu M, Djordjevic SP. 2019. Multidrug resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST405 with a novel, composite IS26 transposon in a unique chromosomal location. *Front Microbiol* 10: 1–10.
 87. de Toro M, Fernández J, García V, Mora A, Blanco J, de la Cruz F, Rodicio MR. 2017. Whole genome sequencing, molecular typing and in vivo virulence of OXA-48-producing *Escherichia coli* isolates including ST131 H30-Rx, H22 and H41 subclones. *Sci Rep* 7: 12103. [Medline] [CrossRef]
 88. Ho PL, Ng KY, Lo WU, Law PY, Lai EL, Wang Y, Chow KH. 2015. Plasmid-mediated OqxAB is an important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 537–543. [Medline] [CrossRef]
 89. Chowdhury PR, Charles IG, Djordjevic SP. 2015. A role for Tn6029 in the evolution of the complex antibiotic resistance gene loci in genomic island 3 in enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS One* 10: 1–15. [CrossRef]
 90. Song HJ, Moon DC, Mechesso AF, Kang HY, Kim MH, Choi JH, Kim SJ, Yoon SS, Lim SK. 2020. Resistance profiling and molecular characterization of extended-spectrum/plasmid-mediated ampe β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy broiler chickens in South Korea. *Microorganisms* 8: 1–17. [Medline] [CrossRef]
 91. Li W, Yan Y, Chen J, Sun R, Wang Y, Wang T, Feng Z, Peng K, Wang J, Chen S, Luo Y, Li R, Yang B. 2021. Genomic characterization of conjugative plasmids carrying the *mer-1* gene in foodborne and clinical strains of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Food Control* 125: 1–13. [CrossRef]
 92. Hamamoto K, Tokunaga T, Yagi N, Hirai I. 2020. Characterization of *bla_{CTX-M-14}* transposition from plasmid to chromosome in *Escherichia coli* experimental strain. *Int J Med Microbiol* 310: 151395. [Medline] [CrossRef]
 93. Reid CJ, Wyrsh ER, Roy Chowdhury P, Zingali T, Liu M, Darling AE, Chapman TA, Djordjevic SP. 2017. Porcine commensal *Escherichia coli*: a reservoir for class 1 integrons associated with IS26. *Microb Genom* 3: 1–13. [Medline]
 94. Salinas L, Cárdenas P, Johnson TJ, Vasco K, Graham J, Trueba G. 2019. Diverse commensal *E. coli* clones and plasmids disseminate antimicrobial resistance genes in domestic animals and children in a semi-rural community in Ecuador. *MSphere* 4: 1–10. [Medline] [CrossRef]
 95. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos Díaz L. 2017. Structural and physiological implications of bacterial cell in antibiotic resistance mechanisms. *Int J Morphol* 35: 1214–1223. [CrossRef]
 96. Racewicz P, Majewski M, Biesiada H, Nowaczewski S, Wilczyński J, Wystalska D, Kubiak M, Pszczola M, Madeja ZE. 2022. Prevalence and characterisation of antimicrobial resistance genes and class 1 and 2 integrons in multiresistant *Escherichia coli* isolated from poultry production. *Sci Rep* 12: 6062. [Medline] [CrossRef]
 97. Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y, Torres C. 2015. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β-lactamases. *Vet J* 203: 315–319. [Medline] [CrossRef]
 98. Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Torres C, Castañeda M, Sánchez GM, Alonso CA, López-Pliego L, Mayen MG, Martínez-Laguna Y, Rocha-Gracia RC. 2016. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* strains producers of extended-spectrum and CMY-2 type beta-lactamases, isolated from turtles in Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16: 595–603. [Medline] [CrossRef]
 99. Barrios-Villa E, Cortés-Cortés G, Lozano P, Romero-Romero S, Lara N, Estepa V, Somalo S, Torres C, Rocha-Gracia R C. 2018. Characterization of extended-spectrum and CMY-2 β-lactamases, and associated virulence genes in *Escherichia coli* from food of animal origin in México. *Br Food J* 120: 1457–1473. [CrossRef]

