



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**



**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE  
CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE  
DIFERENTES HOSPEDEROS EN PUEBLA, MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

M.C. GERARDO CORTÉS CORTÉS

**ASESORAS DE TESIS:**

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA  
D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN

**PUEBLA, PUE.**

**DICIEMBRE, 2016**

# *Agradecimientos*

## ❖ INSTITUCIONALES

- ◆ A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, mi casa durante toda mi preparación profesional, gracias por todo.
- ◆ Al **Instituto de Ciencias** y a todo su personal, por el apoyo brindado en la gestión de todos los requerimientos solicitados, así como por el recurso para la impresión de esta tesis.
- ◆ Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** y a la **Coordinación del Posgrado en Microbiología**, por brindarme la oportunidad de realizar el doctorado y por el apoyo y disponibilidad para tratar cualquier asunto.
- ◆ Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada en la duración de este posgrado, con número de becario 233611; así como por la Beca Mixta para el financiamiento complementario para la estancia de investigación realizada en la Universidad de la Rioja, Logroño, España.
- ◆ A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por el apoyo brindado en los gastos de transportación para realizar la estancia en la Universidad de la Rioja, así como para la asistencia a los distintos congresos internacionales llevados a cabo durante el doctorado.
- ◆ A la **Universidad de la Rioja**, por permitirme realizar una estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Agricultura y Alimentación, misma que permitió desarrollar parte experimental de esta tesis, bajo la dirección de la Dra. Carmen Torres Manrique.
- ◆ Al **Hospital para en Niño Poblano**, por la donación de cepas bacterianas estudiadas en esta tesis, mediante la colaboración con la M.C. Zita Gutiérrez Cázarez, a quién agradezco su confianza, apoyo y disponibilidad en todo momento. Así como a todos los voluntarios que donaron las cepas estudiadas en este trabajo.

## ❖ ACADÉMICOS

- ◆ A mis asesoras:

**D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia.**

**D.C. Patricia Lozano Zarain.**

Pienso en algún momento vivido desde que me permitieron trabajar con ustedes y vienen a mi mente infinidad de recuerdos, podría decirles mil cosas, pero en este momento con toda honestidad les digo simplemente GRACIAS, gracias por su confianza, consejos y apoyo infinito; por creer en mí, por animarme en todo momento y sobre todo por ser las guías perfectas en este camino que no termina, sino que apenas comienza. ¡Las estimo mucho!.

- ◆ A la **Dra. Carmen Torres Manrique**, por guiar esta tesis, por todo el apoyo, disponibilidad y confianza al permitirme realizar una estancia más en su laboratorio; gracias por su amable hospitalidad y por ser un ejemplo de entusiasmo y dedicación al trabajo científico. ¡Mil gracias Carmen!.
- ◆ Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por su apoyo, disponibilidad y confianza al permitirme trabajar en su laboratorio; por su valioso aporte a esta tesis y por ser un ejemplo de dedicación a la mesa de trabajo.
- ◆ Al **D.C. Ygnacio Martínez Laguna**, por su constante disponibilidad en todo momento, por el apoyo y el valioso aporte a esta tesis.
- ◆ Al **D.C. Luis Javier Martínez Morales**, por la disponibilidad, consejos y excelentes comentarios, mismos que permitieron enriquecer esta tesis.
- ◆ A la **D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por su valioso apoyo, disponibilidad y por los comentarios constructivos que enriquecieron este trabajo.
- ◆ Al **D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres**, por permitirme hacer uso de su laboratorio para realizar los experimentos de hibridación y por su disponibilidad en todo momento.
- ◆ A la **M.C. Liliana López Pliego**, por su excelente asesoría en los ensayos de hibridación, por compartirme sus conocimientos y por ser una buena amiga.

# *Dedicatorias*

## ❖ **A mi familia**

Por creer en mí siempre, por apoyarme incondicionalmente y por ser el regalo que me motiva todos los días. Esta tesis es el resultado de un gran esfuerzo no sólo mío, sino también de ustedes, muchas gracias.

## ❖ **A mis amigos**

Mis hermanos por elección, por todos los buenos momentos que hemos vivido, por su constante apoyo y porque simplemente alegran mi vida amigos, gracias.

## ❖ **A mis compañeros**

### ◆ *Del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad*

Afortunadamente, tuve el honor de conocer a muchos colegas e incluso amigos en este laboratorio, que ha sido mi segunda casa en estos años. Gracias *a los de siempre*: Elena, Tatiana, Andrea, Tania, Aimé, Claudia, maestra Alma, Edwin, Enrique, Jessica, Olinca, Erándeni, Yesenia, Angélica, Emilio, Alejandro, Cristina; *a los nuevos*: Marisol, Miranda, Carlos; y a mis ‘*pupilos*’: Gabriela, Omar y Eduardo. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos y por dejarme ser su cómplice de mesa. Los voy a extrañar chicos.

### ◆ *Del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana*

Fue un gusto conocerlas chicas, gracias por adoptarme un rato y por apoyarme en todo momento. Gracias Lili, Valentina, Victoria, Thalía, Gabriela, Araceli, Larisa, Jimena y Miriam.

### ◆ *Del Laboratorio 229, de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, España.*

Chicos, mil gracias por su hospitalidad, compañerismo, complicidad y todos los momentos que pasamos en el laboratorio y fuera de él, como en la Calle Laurel o en esos paseos de campo, por ejemplo. Infinitas gracias Paula, Andrea,

Carmencita, Dani, Rocío, Miriam, Vanesa, Nerea, Leila, Sarra, Filipe, Margarida, Marina, Enrique y Natalia. También a Elena y a Sergio. ¡Los extraño, pero también los llevo conmigo!

Agradezco y dedico esta tesis a todas las personas que han formado parte importante de mi vida, porque sin el cariño de una familia, la compañía de unos amigos, la complicidad de unos compañeros y la guía de unos maestros, este logro no hubiera sido posible.

¡Muchas gracias a todos!

***“En la vida hay cosas que no se dicen, se hacen,  
porque al hacerlas se dicen solas”***

***Woody Allen.***

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | 1  |
| <b>RESUMEN</b> .....   | 2  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 4  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 6  |
| 1. <i>Escherichia coli</i> .....   | 6  |
| 2. $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y co-resistencia hacia otros antimicrobianos ..... | 6  |
| 3. <i>E. coli</i> multirresistentes y su diseminación en diferentes poblaciones .....        | 8  |
| 4. Elementos genéticos movilizables .....  | 9  |
| 5. Clona ST131 .....   | 10 |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | 13 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | 14 |
| <b>DIAGRAMA DE TRABAJO</b> .....   | 15 |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | 16 |
| 1. Recolección de muestras .....   | 16 |
| a) Pacientes pediátricos .....   | 16 |
| b) Perros sanos .....  | 17 |
| c) Tortugas sanas .....  | 19 |
| d) Voluntarios clínicamente sanos (Portadores humanos) .....                                 | 22 |
| 2. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> .....                                      | 23 |
| 3. Susceptibilidad antimicrobiana .....  | 24 |
| 4. Producción fenotípica de BLEE .....   | 24 |
| 5. Obtención de ADN bacteriano .....   | 26 |
| 5.1 Templado .....   | 26 |
| 5.2 ADN plasmídico .....   | 26 |
| 6. Cuantificación de ADN .....   | 26 |
| 7. Caracterización de genes de resistencia e integrones .....                                | 27 |
| 7.1 Genes de resistencia a antimicrobianos .....   | 27 |
| 7.2 Caracterización de integrones .....  | 27 |
| 7.3 Visualización de los productos de PCR .....  | 33 |
| 7.4 Purificación de los productos de PCR .....   | 34 |

|  |            |
|--|------------|
| 7.5 Secuenciación.....   | 34         |
| 7.6 Análisis de secuencias.....                                      | 34         |
| 8. Tipado molecular .....  | 35         |
| 8.1 Determinación de filogrupos.....                                 | 35         |
| 8.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).....             | 39         |
| 8.3 Multilocus Sequence Typing (MLST) .....                          | 40         |
| 8.4 Caracterización de <i>E. coli</i> ST131 .....                    | 41         |
| 9. Determinación de patotipos .....                                  | 42         |
| 10. Transferencia genética .....                                     | 44         |
| 10.1 Conjugación .....   | 44         |
| 11. Caracterización plasmídica.....                                  | 44         |
| 11.1 Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)..... | 45         |
| 11.2 Determinación de número y tamaño de plásmidos .....             | 47         |
| 11.3 Sistemas de adicción plasmídicos .....                          | 48         |
| 12. Localización plasmídica de determinantes de resistencia.....     | 49         |
| 12.1 Ensayos de hibridación.....                                     | 49         |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>57</b>  |
| 1. PERROS SANOS .....  | 57         |
| Resultados .....   | 57         |
| Discusión.....   | 66         |
| TORTUGAS.....  | 69         |
| Resultados .....   | 69         |
| Discusión.....   | 76         |
| 3. PORTADORES HUMANOS .....  | 80         |
| Resultados .....   | 80         |
| Discusión.....   | 87         |
| 4. PACIENTES PEDIÁTRICOS .....                                       | 90         |
| Resultados .....   | 90         |
| Discusión.....   | 98         |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>103</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>105</b> |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | <b>106</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>ANEXOS</b> .....                                      | 120 |
| ANEXO 1 .....  | 121 |
| ANEXO 2 .....  | 123 |
| 5.1 Templado.....  | 123 |
| 5.2 ADN plasmídico.....                                  | 124 |
| 7.4 Purificación de los productos de PCR.....            | 124 |
| 8.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)..... | 125 |
| 10.1 Conjugación .....                                   | 127 |
| 11.2 Determinación de número y tamaño de plásmidos ..... | 128 |
| 12.1 Ensayos de hibridación.....                         | 129 |
| ANEXO 3 .....  | 134 |
| ANEXO 4 .....  | 136 |
| ANEXO 5 .....  | 155 |



## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Título  | Página |
|-------|---|--------|
| 1     | Datos de los pacientes y las muestras obtenidas en el HNP.  | 16     |
| 2     | Datos de las muestras obtenidas de los 53 perros sanos.   | 18     |
| 3     | Datos de las 71 tortugas muestreadas en el herpetario “Cloatcalli”.   | 20     |
| 4     | Datos de los 60 voluntarios clínicamente sanos incluidos en el estudio.   | 22     |
| 5     | Oligonucleótidos utilizados en la identificación de <i>E. coli</i> .  | 23     |
| 6     | Antimicrobianos y valores de corte utilizados en el test de susceptibilidad.  | 25     |
| 7     | Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia y en la estrategia “primer-walking”.  | 30     |
| 8     | Componentes y cantidades utilizados en cada PCR.  | 34     |
| 9     | Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de los productos esperados en cada PCR.   | 37     |
| 10    | Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de filogrupo a los aislados de <i>E. coli</i> .  | 39     |
| 11    | Criterios para el análisis de patrones PFGE- <i>Xba</i> I.  | 42     |
| 12    | Secuencia de oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados en el tipado de <i>E. coli</i> mediante MLST.   | 43     |
| 13    | Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación del gen <i>fimH</i> .   | 44     |
| 14    | Secuencia de oligonucleótidos, determinantes de virulencia y condiciones de PCR utilizados en la determinación de patotipos intestinales.                                     | 45     |
| 15    | Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos.  | 48     |
| 16    | Componentes utilizados en cada PCR para la determinación de replicones plasmídicos.   | 50     |
| 17    | Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídicos.   | 52     |
| 18    | Tipificación molecular, perfil de resistencia y estructura de integrones en las <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> aisladas de muestras fecales de perros sanos.                 | 58     |
| 19    | Genes de resistencia y determinantes plasmídicos localizados en las <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> aisladas de perros.   | 61     |
| 20    | Tipado molecular, β-lactamasas identificadas, tipado de plásmidos y localización de determinantes de resistencia de las <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> aisladas de tortugas. | 70     |
| 21    | Características de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE o pAmpC en relación a integrones y otros mecanismos de resistencia.  | 73     |
| 22    | Tipado molecular y perfil de resistencia de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE aisladas de portadores humanos.   | 81     |
| 23    | Integrones, tipado de plásmidos y localización de genes en las cepas de <i>E. coli</i> BLEE positivas aisladas de portadores humanos.   | 83     |
| 24    | Muestras de las cuales se aislaron las 11 <i>E. coli</i> multirresistentes de origen clínico.   | 90     |
| 25    | Origen, tipado molecular, β-lactamasas identificadas y caracterización plasmídica de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEEs aisladas de pacientes pediátricos.      | 92     |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>26</b> | Otros mecanismos de resistencia en las <i>E. coli</i> BLEE positivas de origen clínico.                              | 93 |
| <b>27</b> | Principales características de las <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> aisladas de todos los hospederos en este trabajo. |    |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Título   | Página |
|--------|--|--------|
| 1      | Estructura poblacional de <i>E. coli</i> ST131, linaje <i>fimH30</i> , sublinajes y otros linajes asociados. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensible a fluoroquinolonas.   | 12     |
| 2      | Posición de discos para determinar la producción fenotípica de BLEEs.  | 26     |
| 3      | Amplificados esperados en la PCR cuádruplex y filogrupo asignado (A, B1, C, E, D, F, B2, <i>E. clades</i> , <i>E. fergusonii</i> y <i>E. albertii</i> ).   | 28     |
| 4      | Dendograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica- <i>Xba</i> I y tipado molecular de las <i>E. coli</i> CTX-R recuperadas de perros sanos.  | 60     |
| 5      | PFGE-S1 de las cepas y transconjugantes aisladas de perros   | 62     |
| 6      | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de perros y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup> P.  | 64     |
| 7      | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de perros y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> marcada con <sup>32</sup> P.   | 65     |
| 8      | Dendograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica- <i>Xba</i> I y tipado molecular de las 11 <i>E. coli</i> productoras de BLEE y CMY-2 aisladas de tortugas.  | 71     |
| 9      | Estructura de los casetes génicos detectados en los integrones de clase 1 y clase 2 en las <i>E. coli</i> aisladas de tortugas.  | 72     |
| 10     | Gel PFGE-S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos en las 11 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de tortugas.  | 74     |
| 11     | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de tortugas y de las transconjugantes. B) Placa fotográfica de la hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup> P. C) Autorradiografía de hibridación para el replicón IncII. | 75     |
| 12     | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de tortugas y de las transconjugantes. B) Placa fotográfica de la hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> marcada con <sup>32</sup> P. C) Autorradiografía de hibridación para el replicón IncFIB.   | 76     |
| 13     | Dendograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica- <i>Xba</i> I y tipado molecular de las <i>E. coli</i> productoras de BLEE recuperadas de humanos sanos.   | 82     |
| 14     | Gel PFGE-S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos en las 11 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de voluntarios sanos.   | 84     |
| 15     | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de portadores humanos y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup> P.  | 85     |
| 16     | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de portadores humanos y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda del replicón FIB marcada con <sup>32</sup> P.  | 86     |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| <b>17</b> | Dendograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica- <i>XbaI</i> y tipado molecular de las cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEEs recuperadas de pacientes pediátricos.          | 94 |
| <b>18</b> | PFGE-S1 de las cepas de <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> aisladas de muestras clínicas, para determinar el número y tamaño de plásmidos.  | 95 |
| <b>19</b> | PFGE-S1 de las cepas de <i>E. coli</i> CTX <sup>R</sup> conjugativas aisladas de muestras clínicas y sus transconjugantes, para determinar el número y tamaño de plásmidos.  | 95 |
| <b>20</b> | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de pacientes pediátricos y de sus transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup> P. | 96 |
| <b>21</b> | A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de pacientes pediátricos y de sus transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda con la sonda del replicón FIB marcada con <sup>32</sup> P.  | 97 |
| <b>22</b> | Sitios de corte de la enzima <i>XbaI</i> ( <a href="https://www.thermofisher.com">https://www.thermofisher.com</a> ).  |    |
| <b>23</b> | Montaje de transferencia <i>Southern blot</i> .  |    |

## ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| AZI <sup>R</sup> | Azida resistente  |
| BHI              | Infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion)                             |
| BLEEs            | $\beta$ -lactamasas de espectro extendido                                   |
| CLSI             | Clinical & Laboratory Standards Institute                                   |
| CTX              | Cefotaxima  |
| CTX <sup>R</sup> | Cefotaxima resistente   |
| h                | Hora  |
| lac -            | Lactosa negativa  |
| lac +            | Lactosa positiva  |
| LB               | Luria Bertani   |
| min              | Minuto  |
| ml               | Mililitro   |
| $\mu$ l          | Microlitro  |
| MLST             | Multilocus sequence typing  |
| mM               | Milimolar   |
| pAmpC            | $\beta$ -lactamasas plasmídicas AmpC  |
| PCR              | Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)             |
| PFGE             | Electroforesis en gel de campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis) |
| RIF <sup>R</sup> | Rifampicina resistente  |
| rpm              | Revoluciones por minuto   |
| RQMP             | Resistencia a Quilonas Mediada por Plásmidos                                |
| seg              | Segundo   |
| SSI              | Solución Salina Isotónica   |
| ST               | Secuencia Tipo  |
| ST-Cplx          | Complejo clonal de secuencia tipo   |
| TSA              | Soya Trypticaseína (Tryptone Soya Agar)                                     |
| UPGMA            | Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages                      |

## RESUMEN

La emergencia y diseminación clonal de *Escherichia coli* multidrogo resistentes entre diferentes hospederos es un problema preocupante de Salud Pública que involucra varios compartimentos ambientales. Los mecanismos de resistencia mediados por elementos genéticos móviles como plásmidos e integrones, están incrementando las tasas de multirresistencia en esta bacteria simbiótica. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar los mecanismos de resistencia a diferentes familias de antimicrobianos, analizar los determinantes plasmídicos involucrados en el mantenimiento y la propagación de genes de resistencia, así como determinar el tipado molecular de cepas de *E. coli* aisladas de perros, tortugas y humanos en la Ciudad de Puebla, México.

Se identificaron un total de 43 cepas de *E. coli* cefotaxima resistentes (CTX<sup>R</sup>) a partir de pacientes pediátricos (11/26, 42%), voluntarios sanos (11/60, 18%), perros (10/53, 17%) y tortugas (11/71, 15.5%). Todas las cepas presentaron resistencia a diferentes antimicrobianos y 29 de ellas presentaron fenotipo BLEE positivo. A excepción de 1 cepa aislada de perro (debido al reducido perfil de resistencia), todas las cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> fueron completamente caracterizadas (n= 42). Se detectaron diferentes genes de resistencia hacia  $\beta$ -lactámicos (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>); quinolonas [*aac(6')Ib-cr*, *qnrB19*, *oqxB*]; aminoglucósidos [*aac(3)-II*, *aadA1/2*]; sulfonamidas (*sul-1*, *sul-3*); cloranfenicol (*cmlA*); trimetoprim (*drfA*) y tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*]; así como diferentes estructuras genéticas en integrones de clase 1 (*drfA17-aadA5*, *aadB-aadA1*) y 2 (*drfA1-sat2-aadA1*) entre los diferentes grupos de cepas. También se identificaron mutaciones en la región reguladora *ampC* (resistencia a  $\beta$ -lactámicos) y en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* (resistencia a quinolonas). Algunos determinantes de resistencia fueron transferidos horizontalmente mediante ensayos de conjugación, siendo las  $\beta$ -lactamasas CTX-M-15 y CMY-2 las más diseminadas en replicones plasmídicos tipo FIA, FIB o II de diferentes tamaños. También se identificaron diversos sistemas de adición plasmídicos, siendo *pemKI*, *ccdAB*, *hok-sok*, *srnBC*, *vagCD*, *pndAC*, *relB* y *parDE* los más prevalentes.

Con la finalidad de determinar la localización plasmídica de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, se realizaron ensayos de hibridación, observándose una alta frecuencia del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> acarreado en plásmidos tipo IncII de diferente tamaño en las cepas de tortugas y perros. Por

otro lado, el gen que codifica para BLEE CTX-M-15 fue localizado en plásmidos tipo IncFIB, hasta en más del 50% en cepas de portadores y pacientes pediátricos.

Las cepas fueron clasificadas en diferentes grupos filogenéticos (número de aislados): A (13), B1 (10), B2 (5), C (1) y D (13). Los grupos filogenéticos B2 y C se encontraron solo en cepas de origen humano. Posteriormente, las cepas fueron asignadas a diferentes secuencias tipo (ST) mediante *multi locus sequence typing* (MLST), con lo cual se detectó la clona ST131-B2-O25:H4/H30Rx en 4 aislados de portadores humanos y en 1 paciente hospitalizado, siendo este el primer reporte en humanos clínicamente sanos en México. Adicionalmente, se detectó un alelo nuevo (585) para el gen *fumC*, originando el nuevo ST4565 en una cepa de perro; también se identificaron cuatro nuevos ST en cepas de portadores (ST5060, ST5079, ST5080 y ST5081), los cuales fueron registrados en la base de datos para *E. coli* de la Universidad de Warwick. La relación clonal de las cepas se determinó mediante el análisis de patrones de restricción PFGE-*XbaI* agrupados en dendogramas UPGMA, reflejando una distribución clonal heterogénea.

Este trabajo reporta el análisis de la clonalidad y multidrogo resistencia de cepas de *E. coli* recuperadas de diferentes reservorios, así como la presencia de los determinantes plasmídicos involucrados en la transferencia de  $\beta$ -lactamasas. Los hallazgos aportan información epidemiológica-molecular que podría ayudar al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, basados en el conocimiento de posibles blancos plasmídicos y con ello proponer estrategias para contener y reducir la resistencia microbiana mediada por enzimas en un futuro cercano.

## ABSTRACT

The spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones through different host species is a serious public health concern that involves many environmental compartments. Moreover, mobile plasmid-mediated resistance mechanisms are increasing multidrug-resistance rates in this symbiotic bacterium. The aim of this study was to analyse the plasmid determinants involved in keeping and carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and plasmid-mediated-AmpC (pAmpC)  $\beta$ -lactamases in *E. coli* strains isolated from human, dog and turtle reservoirs in Puebla, Mexico. In addition, the molecular typing of strains was also carried out in order to characterize the presence of *E. coli* clones and subclones.

Forty-three cefotaxime-resistant (CTX<sup>R</sup>) *E. coli* isolates were recovered from pediatric patients (11/26, 42%), healthy humans (11/60, 18%), healthy dogs (10/53, 17%) and sheltered turtles (11/71, 15.5%). All the *E. coli* strains showed resistance to different antimicrobial agents and 29 of them were producers of ESBL. All the strains (except one of dog origin), were fully characterized (n= 42). Genes encoding ESBL (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14b</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>); pAmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2; plasmid-mediated-quinolone-resistance genes [*aac(6')Ib-cr*, *qnrB19*, *oqxB*]; as well as aminoglycoside [*aac(3)-II*, *aadA1/2*]; sulfonamide (*sul-1*, *sul-3*); chloramphenicol (*cmlA*); trimethoprim (*drfA*) and tetracycline [*tet(A)*, *tet(B)*] resistance genes were detected in the CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates by PCR and sequencing. Mutations in the regulatory region of *ampC*, *gyrA* and *parC* chromosomal genes were also detected. Additionally, several gene cassette arrays in class 1 (*drfA17-aadA5*, *aadB-aadA1*) and 2 (*drfA1-sat2-aadA1*) integrons were identified among the ESBL- or CMY-2-producing isolates. Determinants of resistance were horizontally transferred by conjugation to recipient *E. coli* strains. ESBL CTX-M-15 and the  $\beta$ -lactamase CMY-2 were the most successfully transferred, as well as the plasmid replicons FIB, FIA and II. Furthermore, the plasmid addiction systems *pemKI*, *ccdAB*, *hok-sok*, *srnBC*, *vagCD*, *pndAC*, *relBE* and *parDE*, were also transferred among isolates from different hosts. Plasmid characterization was carried out by the PCR-based replicon typing and the PFGE/S1 strategy was also performed with a subsequent calculation model to approximate the expected plasmid sizes in donor and transconjugant strains. In order to identify the  $\beta$ -lactamases that were carried by plasmids, southern blot hybridization experiments using a radioactive (<sup>32</sup>P) labeling method were performed. Notably, we detected a high frequency of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene carried by



IncI1 plasmids of different sizes in isolates from turtles and dogs. By contrast, the gene encoding CTX-M-15  $\beta$ -lactamase was located on large IncFIB plasmids, mostly in human strains. The strains were distributed into phylogroups (number of isolates) A (13), B1 (10), B2 (5), C (1) y D (13) that were widely distributed among hosts. Only the phylogenetic groups B2 and C were found in human isolates. Most of the *E. coli* strains were assigned to different sequence types (ST) by multi locus sequence typing (MLST), in which the subclone ST131-B2-O25:H4/H30-Rx was identified in isolates from healthy humans. Furthermore, the *fumC* allele 585 and the ST5060, ST5079, ST5080 and ST5081 were detected for the first time, and they were deposited in the *E. coli* MLST database at the University of Warwick. The clonal relationship of all isolates was also investigated by the PFGE-*XbaI* patterns and clustered based on UPGMA dendograms. This study shows the broad distribution and clonality of multidrug-resistant *E. coli* strains among distant reservoirs and highlights the plasmid determinants involved in  $\beta$ -lactamases transfer. These findings may aid the development of new antimicrobial bacterial agents based on the knowledge of strategic plasmid targets, and could help to inform efforts to contain or reduce the antimicrobial resistance mediated by modifying enzymes in the near future.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un microorganismo comensal del tracto intestinal de humanos y de la mayoría de los animales, por lo que provee ciertos beneficios al hospedero y viceversa (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Sin embargo, esta bacteria se ha convertido en un patógeno bien adaptado a su huésped, por lo que puede causar una amplia variedad de enfermedades intestinales o extra-intestinales, tales como diarrea, infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal, por mencionar algunas (Wirth *et al.*, 2006; Croxen y Finlay, 2010; Seiffert *et al.*, 2013). *E. coli* es la bacteria Gram negativa por excelencia usada como modelo de estudio en diversas ramas de la medicina. Diversos autores han clasificado a esta bacteria a través de patrones de restricción enzimática (Gautom *et al.*, 1997), a su relación filogenética mediante la presencia o ausencia de genes específicos (Clermont *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2013) y recientemente, por medio de la amplificación y secuenciación de genes de mantenimiento o “housekeeping”, que permiten la identificación de alelos genéticos cuya combinación determina una secuencia tipo o ST y un complejo clonal (Cplx) específicos, con gran importancia epidemiológica, ya que permite comparar cepas bacterianas independientemente del momento y lugar en el que sean aisladas (Tartof *et al.*, 2005).

### 2. $\beta$ -lactamasas de amplio espectro y co-resistencia hacia otros antimicrobianos

El incremento en la prevalencia de aislados de *E. coli* resistentes a los antimicrobianos es un problema preocupante de Salud Pública, ya que las opciones de tratamiento para infecciones causadas por esta bacteria son cada vez más limitadas, lo que genera entre otras cosas, complicaciones al paciente, prolongación de estancias hospitalarias y aumento en los costos de tratamiento. De manera particular, las cepas multidrogo resistentes productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) han tomado relevancia, ya que inactivan a un grupo de antibióticos usado ampliamente como primera línea de tratamiento, los  $\beta$ -lactámicos. La inactivación enzimática es el principal mecanismo de resistencia adquirida hacia estos antimicrobianos (Jacoby, 2009); sin embargo, también se han descrito otros que funcionan de manera intrínseca, como son cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBP), alteraciones

en las porinas de la membrana externa y bombas de eflujo que se encargan de expulsar al antibiótico una vez que éste ha ingresado a la bacteria (Ruiz *et al.*, 2012).

La terapia antimicrobiana con oxiiimino-cefalosporinas (como cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima o cefepime) es una de las primeras elecciones para tratar infecciones causadas por *E. coli*, mientras que la producción de  $\beta$ -lactamasas es la causa más común de resistencia a gran variedad de estos agentes  $\beta$ -lactámicos (Paterson, 2006). Estas enzimas pueden ser divididas ya sea en las clases A, B, C y D (referida como la clasificación molecular o de Ambler, que se basa en la secuencia de aminoácidos) o en los grupos 1, 2 y 3 (conocida como la clasificación funcional o de Bush-Jacoby, basada en perfiles de sustrato y de inhibición). Las clases A, C, y D necesitan un residuo de serina para tener actividad, por lo que también se conocen como serín  $\beta$ -lactamasas; mientras que las de clase B requieren iones de zinc divalentes, por lo que se denominan metalo  $\beta$ -lactamasas. El grupo 1 hace referencia a serín cefalosporinasas, mientras que al grupo 2 pertenecen las serín  $\beta$ -lactamasas (que incluyen penicilinasas y enzimas de amplio espectro); y al grupo 3 las metalo  $\beta$ -lactamasas (Bush y Jacoby, 2010). Las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro son enzimas con actividad hidrolítica frente a oxiiimino cefalosporinas y/o carbapenémicos. Estas enzimas incluyen a las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC mediadas por plásmidos (como CMY-2), BLEEs de clase A (tipos CTX-M, SHV y TEM), así como carbapenemasas (tipos KPC, VIM, IPM, NDM y OXA-48). Las BLEEs tipo CTX-M son las más ampliamente diseminadas, mientras que NDM, OXA-48 y KPC, son las carbapenemasas más frecuentemente encontradas entre aislados de enterobacterias de origen nosocomial y comunitario (Nordmann and Poirel, 2014). Las BLEEs tipo CTX-M pertenecen a la clase molecular A o al grupo funcional 2be que incluyen al menos seis linajes: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 y KLCU; que difieren entre sí por la homología de su secuencia aminocacídica en un  $\geq 10\%$  (Canton y Coque, 2006). La distribución pandémica de las  $\beta$ -lactamasas CTX-M ha contribuido al incremento en las tasas de resistencia a cefalosporinas con el subsecuente uso de los carbapenémicos en el control de infecciones causadas por bacterias multidrogo resistentes, lo que también ha generado resistencia a este último grupo de antimicrobianos. Desafortunadamente, aislados productores de estas enzimas son frecuentemente co-resistentes a varios grupos de antibióticos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, que son usados tanto en la clínica humana como en la animal, lo que agrava la situación de la multirresistencia, ya que se ha extendido a diferentes ambientes y hospederos (Pitout y Laupland, 2008). Las

infecciones causadas por *E. coli* productoras de BLEEs y carbapenemasas están asociadas con viajeros a las regiones endémicas, por lo que la resistencia bacteriana es un fenómeno globalmente extendido. *E. coli* ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia hacia diferentes grupos de antimicrobianos, como la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP) que incluye a la enzima Aac(6')-Ib (variante -cr), las variantes del gen *qnr* o las bombas de eflujo QepA, OqxA y OqxB; así como a acetilasas (Aac(3)-II) que inactivan a aminoglucósidos o bombas que expulsan tetraciclinas [*tet(A)*, *tet(B)*]; y otros genes de resistencia que actúan sobre derivados de sulfas e inhibidores de la vía folato, por mencionar algunos (Martínez-Martínez *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009).

### 3. *E. coli* multirresistentes y su diseminación en diferentes poblaciones

Las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs se han reportado tanto en humanos como en animales domésticos y salvajes (Cantón *et al.*, 2008; Ben Sallem *et al.*, 2012a; trott *et al.*, 2013), lo que representa un alarmante problema debido a la potencial transferencia de estas cepas entre diferentes hospederos en el ambiente doméstico (Albrechtova *et al.*, 2012). La  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 es una BLEE que se ha diseminado entre humanos y animales y se encuentra asociada principalmente con cepas de *E. coli* del grupo filogenético B2 y secuencia tipo (ST) 131, aunque esta clona es menos frecuente en animales (Cantón *et al.*, 2008; Cortés *et al.*, 2010). Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas tipo AmpC (pAmpC) también han emergido en la medicina humana y veterinaria, debido a su rápida diseminación, siendo la cefamicinasa CMY-2 la pAmpC más frecuentemente reportada entre aislados de *E. coli* (Jacoby, 2009; Hordijk *et al.*, 2013). Las cepas productoras de BLEE y pAmpC han sido detectadas en diferentes hospederos como humanos y animales de compañía (perros, gatos e incluso reptiles), tanto sanos como enfermos en diferentes países (Teshager *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2004; Carattoli *et al.*, 2005; Pomba *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2010; Tamang *et al.*, 2012; Sallem *et al.*, 2013; Bortolaia *et al.*, 2014), incluyendo México; así como en el ambiente hospitalario, animales destinados al consumo humano (pollos y cerdos) y más recientemente, de plantas tratadoras de agua y animales de compañía (Dierikx *et al.*, 2012, Alouache *et al.*, 2014). Las mascotas, incluyendo reptiles, han sido señalados como una fuente potencial de patógenos, como *Salmonella* (Chen *et al.*, 2010; Whitten *et al.*, 2015) y otras enterobacterias (Dierikx *et al.*, 2012). Estos reservorios representan un serio problema debido al riesgo potencial de

transferencia de patógenos multidrogo resistentes hacia sus dueños o viceversa, a través del contacto directo. Recientemente, también se ha sugerido que bacterias resistentes a los antimicrobianos que son aisladas de animales acuáticos como algunas especies de tortugas marinas (*Chelonia mydas* y *Caretta caretta*), pueden ser usadas como bioindicadores de contaminación en hábitats marinos (Foti *et al.*, 2009, Al-Bary *et al.*, 2012).

#### 4. Elementos genéticos movilizables

La diseminación de microorganismos multidrogo resistentes disminuye las opciones terapéuticas, contribuyendo al aumento de la mortalidad y morbilidad en los pacientes. El éxito inminente de clonas multirresistentes está ligado a la propagación de elementos genéticos movilizables, como integrones, transposones y plásmidos, que son capaces de proveer plataformas estables para el mantenimiento y diseminación de genes de resistencia, y que han tenido un papel esencial en la reciente multirresistencia entre microorganismos Gram-negativos, como es el caso de *E. coli* (Woodford *et al.*, 2011).

Los plásmidos son elementos extracromosomales de ADN circular que se encuentran en las bacterias y que se replican independientemente del genoma de la célula huésped. La transferencia horizontal de plásmidos que albergan genes de resistencia es un mecanismo esencial para la dispersión de la resistencia antimicrobiana (Carattoli *et al.*, 2013). Los plásmidos pueden clasificarse por varios criterios, tales como: su tamaño, su número de copias, el rango de hospedero, el tipo de genes que contiene o en base a su grupo de incompatibilidad (Inc) (Cantón *et al.*, 2012); se dice que si dos plásmidos son incapaces de coexistir en la misma bacteria, pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad.

Los plásmidos ligados a la resistencia antimicrobiana se pueden dividir en 2 grupos principales: 1) estrecho rango de hospedero, al cual pertenecen los del grupo de incompatibilidad F (IncF); y 2) amplio rango de hospedero, al que pertenecen los plásmidos IncA/C, IncL/M e IncN. Estos últimos pueden ser fácilmente transferidos entre diferentes especies bacterianas, mientras que los de reducido rango de hospedero tienden a estar restringidos a ciertas especies (Carattoli, 2009; Carattoli *et al.*, 2014). Los plásmidos epidémicos de resistencia pertenecen en su mayoría al grupo IncF con replicones divergentes (FIA, FIB y FII), así como a IncN e IncK con ciertas secuencias de inserción (IS) como *ISEcp1* o *ISCRI*, que son capaces de movilizar, por ejemplo, a genes *bla<sub>CTX-M</sub>* entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (D'Andrea *et al.*, 2013). Así

mismo, estos plásmidos tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia y diseminarse rápidamente entre las enterobacterias, particularmente entre algunas clonas específicas como *E. coli* ST131 (Carattoli, 2009).

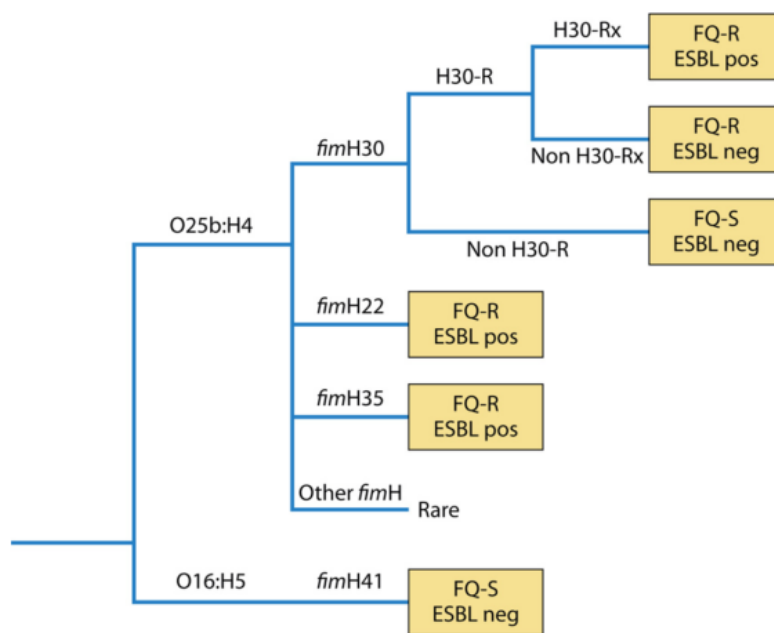
## 5. Clona ST131

En la última década, el grupo clonal ST131 ha emergido como una causa importante de infecciones multidrogo resistentes a nivel mundial (den Reijer *et al.*, 2016). Esta clona se encuentra ampliamente diseminada en el ambiente hospitalario, además de que es comúnmente reportada como productora de BLEE CTX-M-15 o CTX-M-14 y resistente a fluoroquinolonas (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). CTX-M-15 y CTX-M-14 han emergido como los tipos predominantes de BLEE producidas por aislados clínicos de *E. coli* y han sido localizadas en plásmidos conjugativos, lo que facilita su propagación en diferentes huéspedes y ambientes (Blanco *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015).

La alta prevalencia de ST131 en el ambiente comunitario está asociada con el extenso uso de agentes antimicrobianos, lo que sugiere una estrecha relación entre la presión selectiva generada por los antimicrobianos y la creciente prevalencia de esta clona en la comunidad. Esta clona además de ser multiresistente, es conocida por llegar a ser altamente patógena. La patogenicidad de los aislados ST131 ha sido asociada con el cluster *fim*, que está localizado en una región altamente recombinante en el cromosoma de *E. coli*, justo río abajo del locus *leuX* tRNA, en la cual son frecuentemente insertadas islas de patogenicidad, por lo que se considera una zona importante para la captación de genes de virulencia e incluso de resistencia antimicrobiana (Weissman *et al.*, 2012). Específicamente, la fimbria de adhesión tipo 1 FimH, se ha visto involucrada en la patogenicidad de *E. coli*, ya que algunas variantes del gen que codifica para esta proteína, *fimH*, favorecen la colonización uroepitelial en el humano y en modelos murinos (Mora *et al.*, 2014). En particular, la variante *fimH30* (H30) también se ha visto asociada con la alta resistencia a fluoroquinolonas (H30-R) y con la producción simultánea de la BLEE CTX-M-15 (H30-Rx); además de que ha sido reportada como la subclona más prevalente entre aislados clínicos de *E. coli* ST131. Algunos autores han reportado que hasta un 70% de los aislados ST131 que son resistentes a fluoroquinolonas, pertenecen al linaje ST131-*fimH30*, por lo que la dramática diseminación global de la clona ST131 ha contribuido también a la expansión del linaje ST131-*fimH30*. Los análisis filogenéticos indican que esta clona

comprende una serie de sublinajes derivados de un ancestro común *fimH30*, con resistencia a fluoroquinolonas (Price *et al.*, 2013; Banerjee and Johnson, 2014). Con estas investigaciones, los sublinajes se han denominado de la siguiente manera: subclona H30-R, que presenta resistencia a fluoroquinolonas sin el gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>*; y subclona H30-Rx, que de igual manera es resistente a fluoroquinolonas y adicionalmente presenta *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. La clona ST131 se ha dividido en dos principales serotipos, O25b:H4 y O16:H5, asociados a diferentes variantes *fimH* como la 22, 30, 35 y 41 (Figura 1). Sin embargo, la variante *fimH41* sólo se ha relacionado con el serotipo O16:H5, que presenta resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y gentamicina (comparado con *fimH30*), y rara vez en este linaje se ha detectado la presencia de alguna BLEE y/o resistencia a fluoroquinolonas.

La transmisión de *E. coli* ST131 entre miembros de una misma familia y animales de compañía ha sido previamente documentada (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014; Banerjee and Johnson, 2014), con lo que se demuestra que esta clona pudo ser diseminada exitosamente en el ambiente comunitario, augurando así un panorama poco alentador en cuanto al control de infecciones causadas por esta clona multidrogo resistente.



**Figura 1.** Estructura poblacional de *E. coli* ST131, linaje *fimH30*, sublinajes y otros linajes asociados. FQ-R, resistente a fluoroquinolonas; FQ-S, sensible a fluoroquinolonas. Tomada de: Mathers *et al.*, 2015.

## JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos se ha convertido en un alarmante problema de Salud Pública a nivel mundial, debido a la eficacia reducida de una amplia gama de antibióticos utilizados en la terapia de enfermedades infecciosas.

Actualmente, se conocen varios mecanismos por los cuales las bacterias resisten la acción de los antimicrobianos, que van desde mutaciones en genes cromosómicos propios del metabolismo bacteriano, hasta la adquisición de determinantes de resistencia acarreados en elementos genéticos móviles mediante transferencia horizontal, fenómeno que acelera su diseminación incluso entre diferentes géneros bacterianos.

La mayoría de los reportes sobre resistencia bacteriana se ha enfocado hacia la familia *Enterobacteriaceae*, debido a la importancia de este grupo de bacterias en la clínica humana y animal. De esta familia, *Escherichia coli* es la bacteria más estudiada debido a la estrecha relación que guarda con los seres vivos y a su gran versatilidad genética, lo que ha generado gran variedad de reportes sobre la epidemiología molecular de su resistencia en el ámbito clínico humano. Sin embargo, poco se sabe respecto a la resistencia en otros hospederos que albergan a esta bacteria y que mantienen estrecho contacto con el humano, tal es el caso de los animales de compañía.

En México, los reportes sobre este fenómeno son escasos y poco documentados, hecho que no ha permitido un monitoreo epidemiológico adecuado y que en consecuencia ha ocasionado rezago en la implementación de programas de control.

El presente trabajo tuvo como finalidad conocer y caracterizar los mecanismos de resistencia a los antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México; así como describir la tipificación molecular de los aislados y evaluar la transferencia y localización de los determinantes de resistencia involucrados. Esto contribuirá de manera significativa a conocer más sobre la epidemiología molecular de la resistencia antimicrobiana en nuestro país y con ello a implementar programas de contención para este grave problema de Salud Pública.



## OBJETIVOS

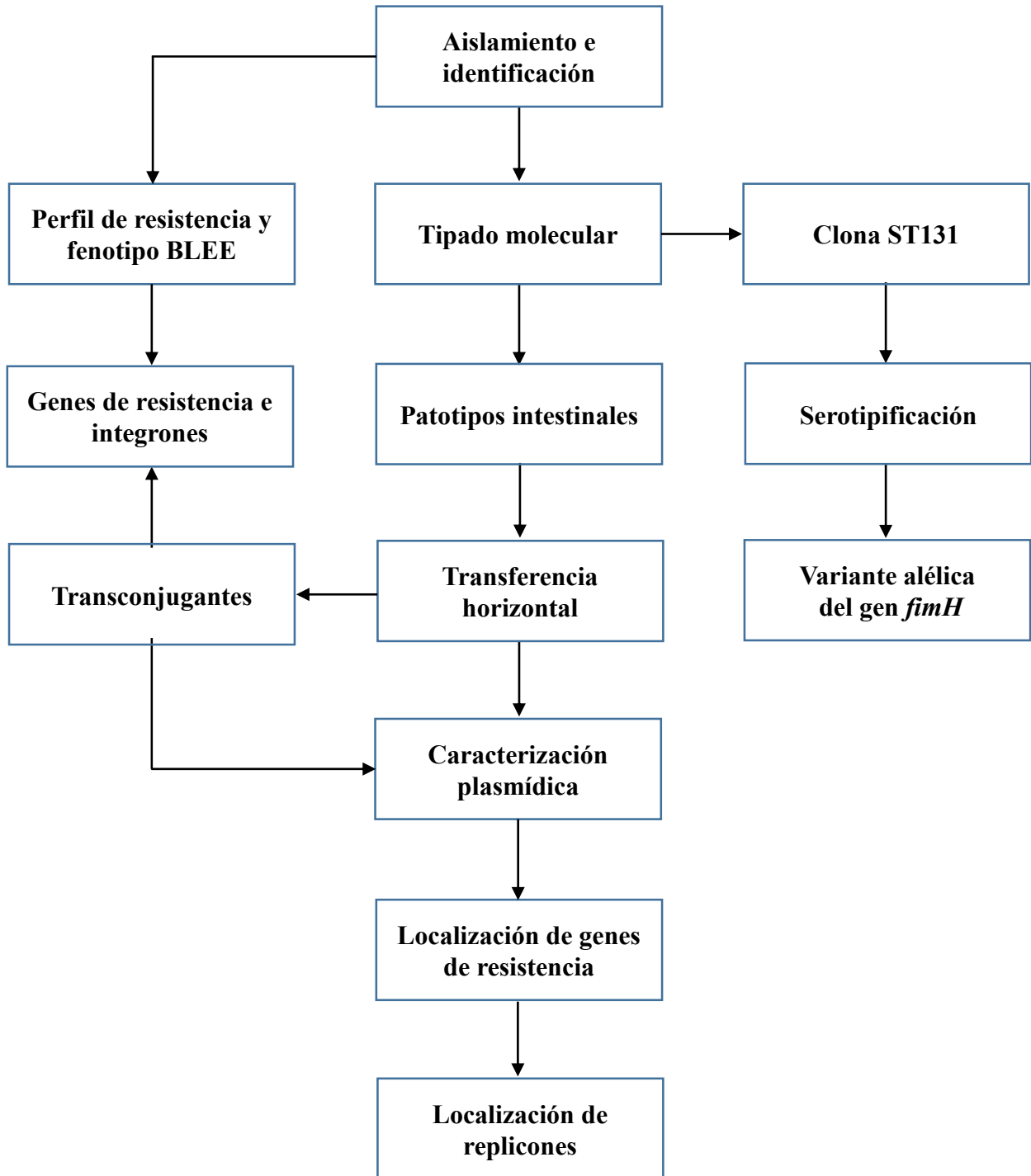
### General:

Caracterizar los mecanismos de resistencia a antimicrobianos y determinar el tipado molecular de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes hospederos en Puebla, México.

### Específicos:

1. Aislar e identificar cepas de *E. coli* a partir de humanos y mascotas (perros y tortugas).
2. Determinar el resistotipo fenotípico y genotípico de las cepas hacia diferentes familias de antimicrobianos, así como la presencia de integrones.
3. Realizar el tipado molecular y determinar la relación clonal de las cepas.
4. Detectar genes de virulencia para patotipos intestinales.
5. Estudiar la transferencia de determinantes de resistencia mediada por plásmidos.
6. Caracterizar el perfil plasmídico en cepas donadoras y transconjugantes.
7. Determinar la localización plasmídica de algunos determinantes de resistencia

DIAGRAMA DE TRABAJO



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Recolección de muestras

#### Población:

|                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| Pacientes pediátricos | 26                    |
| Perros                | 53                    |
| Tortugas              | 71                    |
| Voluntarios sanos     | 60                    |
| <b>Total:</b>         | <b>210 hospederos</b> |

#### a) Pacientes pediátricos

Durante el periodo de abril de 2009 a enero de 2011, en el Laboratorio de Microbiología del Hospital para el Niño Poblano (HNP) ubicado en la Ciudad de Puebla, México, se aislaron cepas de *E. coli* a partir de muestras obtenidas de diferentes sitios anatómicos (líquido de diálisis peritoneal, pulmón, hígado y bazo post-mortem, exudado vulvar y absceso de pared abdominal), provenientes de 26 pacientes hospitalizados (Tabla 1). Cabe mencionar que algunas muestras fueron tomadas del mismo paciente, pero de diferente sitio anatómico o en diferente fecha. Estas cepas fueron identificadas mediante el equipo automatizado Vitek-2 y trasladadas al Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHC) del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) de la BUAP, para su posterior caracterización.

**Tabla 1.** Datos de los pacientes y las muestras obtenidas en el HNP.

| Paciente | Género | Edad (años) | Código de muestra | Fecha de recolección | Origen               |
|----------|--------|-------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| 1        | M      | 4           | 563               | 15/04/2009           | Secreción de absceso |
| 2        | F      | 5           | 552               | 21/06/2009           | Diálisis peritoneal  |
| 3        | F      | 7           | 553               | 19/06/2009           | Líquido peritoneal   |
| 4        | M      | 10          | 551               | 10/07/2009           | Diálisis peritoneal  |
| 5        | M      | 1           | 566               | 27/07/2009           | Secreción de absceso |
| 6        | F      | 1           | 567               | 09/10/2009           | Cavidad abdominal    |
| 7        | M      | 0.1         | 564               | 03/11/2009           | Líquido peritoneal   |
| 8        | F      | 17.1        | 556               | 17/01/2010           | Diálisis peritoneal  |
|          |        |             | 557               | 22/01/2010           | Diálisis peritoneal  |
|          |        |             | 558               | 15/02/2010           | Diálisis peritoneal  |
| 9        | F      | 12          | 554               | 03/02/2010           | Secreción de absceso |

|    |   |      |     |            |   |
|----|---|------|-----|------------|---|
| 10 | F | 6.1  | 555 | 05/03/2010 | Vesícula de piel en tórax               |
| 11 | F | 8    | 565 | 18/03/2010 | Exudado vulvar                          |
|    |   |      | 601 | 18/03/2010 | Exudado vulvar                          |
| 12 | M | 2.2  | 570 | 03/04/2010 | Herida quirúrgica                       |
| 13 | F | 17   | 571 | 25/04/2010 | Tejido de pared abdominal               |
| 14 | F | 8    | 559 | 29/04/2010 | Post-mortem pulmón Derecho              |
|    |   |      | 561 | 29/04/2010 | Post-mortem Hígado                      |
|    |   |      | 562 | 29/04/2010 | Post-mortem Bazo                        |
|    |   |      | 568 | 29/04/2010 | Post-mortem pulmón Izquierdo            |
| 15 | M | 2.8  | 560 | 05/05/2010 | Diálisis peritoneal                     |
|    |   |      | 569 | 08/05/2010 | Diálisis peritoneal                     |
| 16 | M | 4.7  | 602 | 20/07/2010 | Herida quirúrgica                       |
| 17 | M | 12.8 | 603 | 21/07/2010 | Herida quirúrgica                       |
| 18 | M | 15   | 604 | 08/08/2010 | Absceso pared abdominal                 |
|    |   |      | 605 | 08/08/2010 | Absceso pared abdominal                 |
| 19 | F | 8    | 606 | 14/08/2010 | Líquido peritoneal                      |
| 20 | M | 13.7 | 607 | 07/09/2010 | Líquido peritoneal                      |
| 21 | F | 4.1  | 608 | 17/09/2010 | Líquido peritoneal                      |
| 22 | F | 0.1  | 609 | 22/09/2010 | Líquido peritoneal                      |
|    |   |      | 610 | 22/09/2010 | Líquido peritoneal                      |
| 23 | F | 0.8  | 643 | 17/01/2011 | Secreción de absceso de pared abdominal |
| 24 | M | 2    | 644 | 24/01/2011 | Líquido peritoneal                      |
|    |   |      | 646 | 24/01/2011 | Líquido peritoneal                      |
| 25 | F | 4    | 648 | 26/01/2011 | Líquido peritoneal                      |
| 26 | M | 0.3  | 649 | 30/01/2011 | Líquido peritoneal                      |

F, femenino; M, masculino

### b) Perros sanos

En el periodo de julio de 2011 a febrero de 2012, fueron recolectadas muestras fecales de 53 perros sanos en la zona urbana de la Ciudad de Puebla, México. Los perros fueron seleccionados al azar con base a un cuestionario hecho a los dueños (ver anexo 1), considerando que no estuvieran cursando por algún proceso infeccioso u otro padecimiento aparente y que no hubieran recibido tratamiento con antibióticos por un lapso no menor a 12 meses antes de la toma de muestra. Una muestra por animal fue recolectada por el dueño con ayuda de un hisopo estéril inmediatamente después de que el perro defecara (Tabla 2), las muestras se transportaron en medio Stuart al LMHC donde se conservaron a 4 °C hasta por 48 horas para su procesamiento.

**Tabla 2.** Datos de las muestras obtenidas de los 53 perros sanos.

| No. de muestra | Fecha de recolección | Colonia (Ciudad de Puebla) | Perro             |              |
|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------|--------------|
|                |                      |                            | Sexo <sup>a</sup> | Edad (meses) |
| 1              | 07/07/2011           | Loma linda                 | H                 | 17           |
| 2              | 08/09/2011           | Sta. Cruz, Los Ángeles     | H                 | 11           |
| 3              | 08/09/2011           | Loma Linda                 | H                 | 20           |
| 4              | 12/09/2011           | Los Héroes Periférico      | M                 | 18           |
| 5              | 12/09/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 16           |
| 6              | 12/09/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 15           |
| 7              | 12/09/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 20           |
| 8              | 12/09/2011           | Los Héroes Periférico      | M                 | 24           |
| 9              | 05/10/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 19           |
| 10             | 05/10/2011           | Loma Linda                 | M                 | 36           |
| 11             | 16/10/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 13           |
| 12             | 16/10/2011           | Los Héroes Periférico      | M                 | 27           |
| 13             | 16/10/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 14           |
| 14             | 16/10/2011           | Los Héroes Periférico      | H                 | 18           |
| 15             | 16/10/2011           | Los Héroes Periférico      | M                 | 21           |
| 16             | 07/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 19           |
| 17             | 07/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 13           |
| 18             | 07/11/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 26           |
| 19             | 07/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 18           |
| 20             | 16/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 30           |
| 21             | 16/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 19           |
| 22             | 16/11/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 29           |
| 23             | 16/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 26           |
| 24             | 16/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 31           |
| 25             | 29/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 18           |
| 26             | 29/11/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 23           |
| 27             | 29/11/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 28           |
| 28             | 29/11/2011           | Jardines de San Manuel     | M                 | 19           |
| 29             | 30/11/2011           | Jardines de San Manuel     | H                 | 29           |

|    |            |                        |   |    |
|----|------------|------------------------|---|----|
| 30 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | H | 30 |
| 31 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | H | 32 |
| 32 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | M | 24 |
| 33 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | H | 26 |
| 34 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | M | 20 |
| 35 | 30/11/2011 | Jardines de San Manuel | H | 36 |
| 36 | 06/12/2011 | Jardines de San Manuel | H | 28 |
| 37 | 06/12/2011 | Jardines de San Manuel | H | 33 |
| 38 | 06/12/2011 | Jardines de San Manuel | M | 22 |
| 39 | 06/12/2011 | Jardines de San Manuel | M | 25 |
| 40 | 06/12/2011 | Jardines de San Manuel | M | 30 |
| 41 | 18/01/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 5  |
| 42 | 18/01/2012 | Los Héroes Periférico  | M | 38 |
| 43 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 22 |
| 44 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 19 |
| 45 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | M | 31 |
| 46 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 25 |
| 47 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 6  |
| 48 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 14 |
| 49 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | M | 17 |
| 50 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | M | 22 |
| 51 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 33 |
| 52 | 13/02/2012 | Los Héroes Periférico  | H | 28 |
| 53 | 29/02/2012 | Grajales               | M | 47 |

<sup>a</sup>: H, hembra; M, macho

### c) Tortugas sanas

En 2012 se recolectaron hisopados cloacales de 71 tortugas adultas sanas que se encontraban resguardadas en el Herpetario “Cloatcalli” de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Puebla, México). Se muestrearon 34 hembras y 37 machos de los géneros *Kinosternon integrum* (n= 37), *Trachemys scripta elegans* (n= 30), *Chelydra serpentina* (n= 3) y *Rhinoclemmys* spp. (n= 1) (Tabla 3). Previo a su resguardo, las tortugas habían sido recolectadas del ambiente por estudiantes durante sus prácticas de campo (n= 4) o

habían sido adquiridas como mascotas y después donadas voluntariamente por sus dueños al herpetario (n= 67). Una vez en el herpetario, las tortugas fueron alimentadas con hígado de pollo, vegetales, tenebrios y croquetas comerciales (Tortuguetas®). Una muestra por animal fue tomada con un hisopo estéril directamente de la cloaca y esta fue transportada en medio Stuart al LMHC para su procesamiento.

**Tabla 3.** Datos de las 71 tortugas muestreadas en el herpetario “Cloatcalli”.

| Muestra | Tortuga                          |                   | Fecha de colecta |
|---------|----------------------------------|-------------------|------------------|
|         | Especie                          | Sexo <sup>a</sup> |                  |
| 1       | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 28/08/2012       |
| 2       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 28/08/2012       |
| 3       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 28/08/2012       |
| 4       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 28/08/2012       |
| 5       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 28/08/2012       |
| 6       | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 28/08/2012       |
| 7       | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 28/08/2012       |
| 8       | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 28/08/2012       |
| 9       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 9       | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 10      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 11      | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 10/09/2012       |
| 12      | <i>Kinosternon integrum</i>      | H                 | 10/09/2012       |
| 13      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 14      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 15      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 16      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 17      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 18      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 19      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 20      | <i>Kinosternon integrum</i>      | Ma                | 10/09/2012       |
| 21      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 22      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 23      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 10/09/2012       |
| 24      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 02/10/2012       |
| 25      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 02/10/2012       |
| 26      | <i>Kinosternon integrum</i>      | M                 | 02/10/2012       |
| 27      | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H                 | 02/10/2012       |
| 28      | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M                 | 02/10/2012       |
| 29      | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M                 | 02/10/2012       |
| 30      | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H                 | 02/10/2012       |
| 31      | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H                 | 02/10/2012       |

|    |                                  |   |            |
|----|----------------------------------|---|------------|
| 32 | <i>Kinosternon integrum</i>      | M | 02/10/2012 |
| 33 | <i>Kinosternon integrum</i>      | M | 02/10/2012 |
| 34 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 02/10/2012 |
| 35 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 02/10/2012 |
| 36 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 02/10/2012 |
| 37 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 02/10/2012 |
| 38 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 02/10/2012 |
| 39 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 02/10/2012 |
| 40 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 02/10/2012 |
| 41 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 09/10/2012 |
| 42 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 09/10/2012 |
| 43 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 09/10/2012 |
| 44 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 45 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 46 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 47 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 48 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 49 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 50 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 51 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 52 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 09/10/2012 |
| 53 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 09/10/2012 |
| 54 | <i>Chelydra serpentina</i>       | H | 16/10/2012 |
| 55 | <i>Chelydra serpentina</i>       | M | 16/10/2012 |
| 56 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 16/10/2012 |
| 57 | <i>Chelydra serpentina</i>       | M | 16/10/2012 |
| 58 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 16/10/2012 |
| 59 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 16/10/2012 |
| 60 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | M | 16/10/2012 |
| 61 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 16/10/2012 |
| 62 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 16/10/2012 |
| 63 | <i>Trachemys scripta elegans</i> | H | 16/10/2012 |
| 64 | <i>Rhinoclemmys spp</i>          | H | 16/10/2012 |
| 65 | <i>Kinosternon integrum</i>      | M | 16/10/2012 |
| 66 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |
| 67 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |
| 68 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |
| 69 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |
| 70 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |
| 71 | <i>Kinosternon integrum</i>      | H | 12/11/2012 |

<sup>a</sup>: H, hembra; M, macho



**d) Voluntarios clínicamente sanos (Portadores humanos)**

Durante el periodo de enero a abril de 2012, se obtuvieron muestras fecales de 60 individuos clínicamente sanos en la zona urbana de Ciudad de Puebla, México. Los individuos incluidos en el estudio participaron de manera voluntaria, tuvieron un rango de edad de 17 a 56 años y se les realizó un cuestionario médico previo a la recolección de la muestra (ver anexo 1). Ninguno de los voluntarios padecía alguna enfermedad diarreica, crónica o sistémica ni había tenido exposición a algún antimicrobiano por al menos 3 meses antes de la toma de muestra. Cabe mencionar que algunos de ellos eran familiares que cohabitaban en la misma casa (Tabla 4). La muestra fue recolectada por el mismo individuo a partir de las heces, con hisopo estéril, con las indicaciones previas recomendadas por el personal del laboratorio. Por cuestiones de confidencialidad, al paciente se le ubicó con un número consecutivo (de 1 al 60), mismo que corresponde al turno en que se recolectó su muestra (Tabla 4). De igual manera, el hisopo fue colocado en el medio de transporte Stuart para su resguardo y procesamiento.

**Tabla 4.** Datos de los 60 voluntarios clínicamente sanos incluidos en el estudio.

| Número de voluntario | Edad | Género | Número de voluntario | Edad | Género |
|----------------------|------|--------|----------------------|------|--------|
| 1                    | 19   | F      | 31                   | 25   | M      |
| 2                    | 15   | M      | 32                   | 47   | M      |
| 3                    | 16   | M      | 33                   | 45   | F      |
| 4                    | 42   | F      | 34*                  | 54   | F      |
| 5                    | 37   | F      | 35                   | 36   | F      |
| 6                    | 17   | F      | 36                   | 22   | F      |
| 7                    | 18   | F      | 37                   | 52   | M      |
| 8                    | 29   | F      | 38                   | 53   | F      |
| 9                    | 15   | M      | 39                   | 21   | F      |
| 10                   | 43   | F      | 40*                  | 21   | M      |
| 11                   | 17   | F      | 41                   | 26   | F      |
| 12                   | 50   | F      | 42                   | 53   | F      |
| 13                   | 17   | M      | 43                   | 36   | M      |
| 14                   | 20   | F      | 44                   | 56   | F      |
| 15                   | 52   | M      | 45**                 | 29   | M      |
| 16                   | 47   | F      | 46**                 | 45   | F      |
| 17                   | 36   | M      | 47**                 | 52   | F      |
| 18                   | 32   | F      | 48                   | 22   | F      |
| 19                   | 18   | F      | 49**                 | 25   | M      |
| 20                   | 19   | M      | 50                   | 23   | F      |
| 21                   | 56   | F      | 51                   | 20   | F      |
| 22                   | 19   | M      | 52                   | 24   | M      |
| 23                   | 22   | M      | 53                   | 23   | M      |
| 24                   | 25   | F      | 54                   | 45   | F      |

|           |    |   |           |    |   |
|-----------|----|---|-----------|----|---|
| <b>25</b> | 33 | F | <b>55</b> | 23 | F |
| <b>26</b> | 19 | F | <b>56</b> | 60 | F |
| <b>27</b> | 37 | M | <b>57</b> | 16 | M |
| <b>28</b> | 17 | F | <b>58</b> | 55 | F |
| <b>29</b> | 15 | M | <b>59</b> | 27 | M |
| <b>30</b> | 24 | M | <b>60</b> | 23 | F |

F, femenino; M, masculino.

\*, \*\* voluntarios de la misma casa, respectivamente.

## 2. Aislamiento e identificación de *E. coli*

Con la finalidad de obtener cepas presuntamente productoras de BLEEs, todas las muestras fueron sembradas en placas de agar Levine (BD Difco®) suplementado con 2µg/ml de la cefalosporina de tercera generación Cefotaxima (CTX), para recuperar bacterias cefotaxima-resistentes (CTX<sup>R</sup>) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Colonias CTX<sup>R</sup> con morfología típica de *E. coli* (colonias de color verde metálico brillante) fueron seleccionadas al azar (hasta 3 colonias por muestra) e identificadas siguiendo los criterios de Cowan y Steel y pruebas bioquímicas clásicas: tinción de Gram, fermentación de lactosa, movilidad, producción de indol, descarboxilación de ornitina, descarboxilación de la lisina, producción de ureasa y la prueba de Voges-Proskauer. Los resultados se compararon con los esquemas de identificación señalados por Cowan y Steel en el manual de Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003) y utilizando la clasificación taxonómica propuesta en la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005). Adicionalmente, se realizó la detección por PCR del gen *uidA* (Tabla 5), que codifica para la enzima β-glucoronidasa de *E. coli* (Ben Sallem *et al.*, 2014). Las cepas provenientes del HNP, aunque ya habían sido previamente identificadas como *E. coli* por el equipo automatizado, también fueron sometidas al proceso de identificación antes mencionado. Una vez identificadas, las cepas fueron guardadas a -70 °C en viales con caldo infusión cerebro-corazón (BHI)/glicerol al 10% (vol/vol) hasta su uso.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados en la identificación de *E. coli*.

| Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3') | Condiciones de amplificación | Referencia (tamaño)                             |
|--------------------------------------|------------------------------|---|
| <i>uidA</i>                          | 94°C 5 min. 1 ciclo          | Ben Sallem <i>et al.</i> , 2014<br><br>(486 pb) |
| uidA1: ATCACCGTGGTGACGCATGTCGC       | 94°C 30 seg.                 |   |
| uidA2: CACCACGATGCCATGTTCATCTGC      | 50°C 1 min. 35 ciclos        |   |
|                                      | 72°C 1 min.                  |   |
|                                      | 72°C 5 min. 1 ciclo          |   |

### 3. Susceptibilidad antimicrobiana

A las *E. coli* CTX<sup>R</sup> se les determinó la susceptibilidad a 18 antimicrobianos de diferente familia (Tabla 6), mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer:

Un cultivo puro de 24 horas, sembrado en agar TSA (BD Bioxon®), se resuspendió en un tubo con 5 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85% (masa/volumen) de NaCl, hasta alcanzar una turbidez a 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). De esta suspensión se impregnó un hisopo de algodón estéril y se inocularon placas de agar Müeller-Hinton (BD Bioxon®), empezando en la parte superior de la placa deslizando el hisopo sobre la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 45° cada vez y pasándolo por último sobre la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Posteriormente, se colocaron los discos de antimicrobianos (BBL<sup>TM</sup>) y las placas se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C. Finalmente, se midieron los halos de inhibición y los resultados se interpretaron de acuerdo a los valores establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) (Tabla 6). *E. coli* ATCC 25922 fue usada como cepa control.

### 4. Producción fenotípica de BLEE

A los aislados resistentes a cefalosporinas de amplio espectro se les determinó la producción fenotípica de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) mediante la técnica de difusión con doble disco, usando discos de cefotaxima (30  $\mu$ g), ceftazidima (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g) y cefepime (30  $\mu$ g), colocados en las proximidades de un disco central de amoxicilina con ácido clavulánico (20/10  $\mu$ g) a una distancia de 25 mm (extremo-extremo) (Figura 2). El procedimiento para esta técnica es similar al de Kirby-Bauer, diferenciándose únicamente en la distribución de los discos.

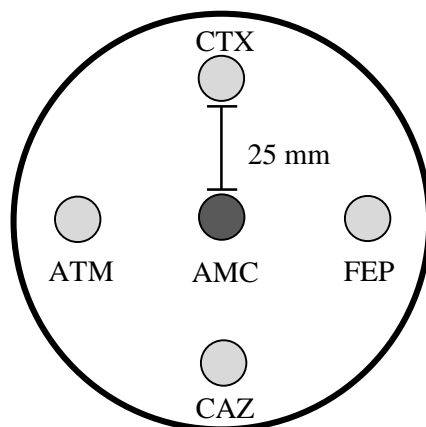
La aparición de un efecto sinérgico (prolongación del halo de inhibición) entre los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y el disco central que contiene al inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (Acido Clavulánico) fue considerado como resultado positivo de producción de BLEE.

**Tabla 6.** Antimicrobianos y valores de corte utilizados en el test de susceptibilidad.

| Grupo o familia  | Antimicrobiano                                 | Concentración<br>( $\mu$ g) | Halo de inhibición (mm) y<br>criterio de interpretación <sup>a</sup> |       |                |                        |
|--|--|-----------------------------|--|-------|----------------|------------------------|
|  |  |                             | S  | SDD   | I              | R                      |
| Penicilinas  | Ampicilina (AMP)                               | 10                          | $\geq 17$  |       | 14-16          | $\leq 13$              |
| $\beta$ -<br>lactámico/inhibidor<br>de $\beta$ -lactamasas | Amoxicilina con<br>ácido clavulánico<br>(AMC)  | 20/10                       | $\geq 18$  |       | 14-17          | $\leq 13$              |
| Cefalosporinas   | Cefoxitina (FOX)                               | 30                          | $\geq 18$  |       | 15-17          | $\leq 14$              |
|  | Ceftazidima (CAZ)                              | 30                          | $\geq 21$  |       | 18-20          | $\leq 17$              |
|  | Cefotaxima (CTX)                               | 30                          | $\geq 26$  |       | 23-25          | $\leq 22$              |
|  | Cefepime (FEP)                                 | 30                          | $\geq 25$  | 19-24 |                | $\leq 18$              |
| Monobactámicos   | Aztreonam (ATM)                                | 30                          | $\geq 21$  |       | 18-20          | $\leq 17$              |
| Carbapenémicos   | Imipenem (IMP)                                 | 10                          | $\geq 23$  |       | 20-22          | $\leq 19$              |
|  | Meropenem (MEM)                                | 10                          | $\geq 23$  |       | 20-22          | $\leq 19$              |
| Quinolonas   | Ácido Nalidíxico<br>(ANA)                      | 30                          | $\geq 19$  |       | 14-18          | $\leq 13$              |
| Fluoroquinolonas   | Ciprofloxacino (CIP)                           | 5                           | $\geq 21$<br>$\geq 31^*$   |       | 16-20<br>21-30 | $\leq 15$<br>$\leq 20$ |
| Aminoglucósidos  | Gentamicina (GEN)                              | 10                          | $\geq 15$  |       | 13-14          | $\leq 12$              |
|  | Tobramicina (TOB)                              | 10                          | $\geq 15$  |       | 13-14          | $\leq 12$              |
|  | Amikacina (AMK)                                | 30                          | $\geq 17$  |       | 15-16          | $\leq 14$              |
|  | Estreptomina (EST)                             | 10                          | $\geq 15$  |       | 12-14          | $\leq 11$              |
| Tetraciclinas  | Tetraciclina (TET)                             | 30                          | $\geq 15$  |       | 12-14          | $\leq 11$              |
| Inhibidores de la vía<br>folato                            | Trimetoprim con<br>Sulfametoxazol<br>(TMP/SXT) | 1.25/23.75                  | $\geq 16$  |       | 11-15          | $\leq 10$              |
| Fenicoles  | Cloranfenicol (CLO)                            | 30                          | $\geq 18$  |       | 13-17          | $\leq 12$              |

<sup>a</sup>: Los puntos de corte se interpretaron de acuerdo al CLSI, versión 2015.

S: Sensible. SDD: Susceptibilidad dosis dependiente, I: Intermedio; R: Resistente



**Figura 2.** Posición de discos para determinar la producción fenotípica de BLEEs.

## 5. Obtención de ADN bacteriano

Con la finalidad de caracterizar los mecanismos de resistencia y determinar el tipado molecular de las cepas, se procedió a obtener el material genético mediante las siguientes metodologías:

### 5.1 Templado

5.1.1 Técnica de hervido.

5.1.2 Wizard Genomic DNA Purification Kit.

### 5.2 ADN plasmídico

5.2.1 QIAprep® Spin Miniprep kit.

Ver anexo 2.

## 6. Cuantificación de ADN

La concentración y pureza del ADN se midió en el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®) a una absorbancia de 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm reflejó la concentración de ADN, considerando 1 unidad de densidad óptica equivalente a 50 µg/ml de ADN de doble cadena; mientras que la pureza (únicamente del ADN puro, no del templado) fue determinada por el cociente entre las absorbancias obtenidas a 260 nm y a 280 nm. Una preparación pura de ADN presentó un cociente entre 1.8 y 2.0, siendo menor en caso de que hubiera proteínas o restos de algún reactivo usado en la extracción. La concentración utilizada en las PCR estuvo en el rango de 300-600 ng/µl.

## 7. Caracterización de genes de resistencia e integrones

### 7.1 Genes de resistencia a antimicrobianos

En base al perfil de resistencia, se hizo una selección de oligonucleótidos específicos para amplificar determinantes de resistencia y casetes génicos mediante la técnica de PCR (Tabla 7). A los aislados que mostraron fenotipo BLEE positivo se les realizó la búsqueda de genes codificantes de enzimas cefalosporinasas de amplio espectro: *bla*<sub>CTX-M</sub> (grupos 1, 2, 8 y 9), *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub>; iniciando con oligonucleótidos universales en el caso de *bla*<sub>CTX-M</sub> (diseñados a partir de una región conservada en todas las variantes). *E. coli* C1550 fue usada como control positivo de los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (grupo 1) y *bla*<sub>TEM</sub> (Rocha-Gracia *et al.*, 2010); mientras que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 se usó como control positivo del gen *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA</sub>. Todos los productos de PCR fueron secuenciados para determinar la variante de cada β-lactamasa.

A las *E. coli* resistentes a cefoxitina (FOX<sup>R</sup>) se les determinó la presencia de genes tipo AmpC mediante una PCR múltiplex: *mox*, *fox*, *cit*, *dha-1*, *acc*, *fox* y *ebcm* (Perez-Perez and Hanson, 2002). Las cepas que resultaron positivas al gen *cit* fueron sometidas a la búsqueda del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> mediante PCR y secuenciación. En los aislados FOX<sup>R</sup> y/o amoxicilina con ácido clavulánico resistentes, se estudió la presencia de mutaciones puntuales en la región promotora-reguladora del gen *ampC*. Las secuencias de los amplicones se compararon con la misma región en *E. coli* K12 para analizar las mutaciones relacionadas con la sobre expresión de la β-lactamasa AmpC (Caroff *et al.*, 2000; Vinue *et al.*, 2008).

Paralelamente, se determinó la presencia de genes de resistencia a quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* y *oqxB*], aminoglucósidos [*aac(3)-II*, *aadA1/2*], sulfonamidas (*sul-1*, *sul-3*), tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*], trimetoprim (*drfA*) y cloranfenicol (*cmlA*) en todas las *E. coli* CTX<sup>R</sup>. También se analizaron mutaciones en las subunidades de los genes cromosomales *gyrA* y *parC* en aquellos aislados que fueron resistentes a quinolonas.

### 7.2 Caracterización de integrones

La presencia de integrones clase 1 y 2 se determinó con la amplificación de los genes *intI1* e *intI2*, respectivamente; mientras que la estructura de los casetes génicos localizados en la región variable se determinó mediante la estrategia “primer-walking” (Saenz *et al.*, 2010).

Esta metodología consistió en combinar diferentes oligonucleótidos (Tabla 7) para amplificar por PCR toda de la región variable del integrón. Los amplificadores fueron secuenciados y analizados por traslape o complementación para determinar la secuencia nucleotídica completa. También se identificó la región 3' conservada de los integrones de clase 1 (genes *qacEΔ1-sul1*). En todas las reacciones de PCR se incluyeron controles positivos (ADN proveniente de cepas portadoras del gen de interés ya secuenciado), negativos (ADN de cepas carentes del gen de interés) o blancos (reacción con todos los componentes excepto ADN). El blanco sólo se usó en aquellos casos donde no se contara con control negativo, junto con un marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific®; O' GeneRuler®).

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la identificación de genes de resistencia e integrones, así como las condiciones de amplificación y el tamaño del producto de PCR se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación de genes de resistencia y en la estrategia “primer-walking”.

| Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3')  | Condiciones de amplificación  | Referencia (tamaño)                               |
|---|---|---|
| <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub><br>CTXM-UNI-F: CGATGTGCAGTACCAGTAA<br>CTXM-UNI-R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG          | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>52°C 30 seg. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo   | Batchelor <i>et al.</i> ,<br>2005<br><br>(566 pb) |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 1</sub><br>CTX-M13U: GGTAAAAAATCACTGCGYC<br>CTX-M13D: TTGGTGACGATTTTAGCCGC      | 94°C 7 min. 1 ciclo<br>94°C 50 seg.<br>50°C 40 seg. 35 ciclos<br>68°C 1 min.<br>68°C 5 min. 1 ciclo   | Briñas <i>et al.</i> ,<br>2005<br><br>(843 pb)    |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 2</sub><br>CTX-M-2-F: ATGATGACTCAGAGCATTCG<br>CTX-M-2-R: TCAGAAACCGTGGGTTAC     | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>52°C 30 seg. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo   | Bertrand <i>et al.</i> ,<br>2006<br><br>(876 pb)  |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 8</sub><br>CTX-M-8-F: TGATGAGACATCGCGTTAAG<br>CTX-M-8-R: TAACCGTCGGTGACGATTTT   | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>52°C 30 seg. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo   | Hopkins <i>et al.</i> ,<br>2006<br><br>(866 pb)   |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub><br>CTX-M-9-F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG<br>CTX-M-9-R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC | 94°C 3 min. 1 ciclo<br>94°C 45 seg.<br>62°C 45 seg. 35 ciclos<br>72°C 45 seg.<br>72°C 10 min. 1 ciclo | Coque <i>et al.</i> ,<br>2002<br><br>(857 pb)     |
| <i>bla</i> <sub>TEM</sub><br>TEM-F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC<br>TEM-R: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC                     | 94°C 3 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>60°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo     | Belaouaj <i>et al.</i> ,<br>1994<br><br>(1029 pb) |
| <i>bla</i> <sub>SHV</sub><br>SHV-F: CACTCAAGGATGTATTGTG<br>SHV-R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG                       | 96°C 15 seg. 1 ciclo<br>96°C 15 seg.<br>52°C 15 seg. 24 ciclos<br>72°C 2 min.<br>72°C 3 min. 1 ciclo  | Pitout <i>et al.</i> ,<br>1998<br><br>(883 pb)    |
| <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub><br>OXA-1: CCAAAGACGTGGATG<br>OXA-2: GTTAAATTCGACCCCAAGTT                        | 96°C 5 min. 1 ciclo<br>96°C 1 min.<br>61°C 1 min. 35 ciclos<br>72°C 2 min.<br>72°C 10 min. 1 ciclo    | Briñas <i>et al.</i> ,<br>2003<br><br>(442 pb)    |
| <i>mox</i><br>MOX-F: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT<br>MOX-R: CACATTGACATAGGTGTGGTGC                                 | 94°C 3 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>64°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 1 min.                          | Pérez-Pérez and<br>Hanson 2002<br><br>(520 pb)    |



|  |  |   |
|--|--|---|
| <i>cit</i><br>CIT-F: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA<br>CIT-R: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC                                     | 72°C 7 min. 1 ciclo<br>(PCR múltiplex)   | Pérez-Pérez and Hanson 2002<br><br>(462 pb)     |
| <i>dha-1</i><br>DHA-1-F: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT<br>DHA-1-R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC                              |  | Pérez-Pérez and Hanson 2002<br><br>(406 pb)     |
| <i>acc</i><br>ACC-F: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA<br>ACC-R: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC                                     |  | Pérez-Pérez and Hanson 2002<br><br>(346 pb)     |
| <i>fox</i><br>FOX-F: AACATGGGGTATCAGGGAGATG<br>FOX-R: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG                                    |  | Pérez-Pérez and Hanson 2002<br><br>(190 pb)     |
| <i>ebcm</i><br>EBCM-F: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG<br>EBCM-R: CTCCACTGCGGCTGCCAGTT                                   |  | Pérez-Pérez and Hanson 2002<br><br>(302 pb)     |
| <i>bla</i> <sub>AmpC</sub><br>AMPC CAROFF-1:<br>AATGGGTTTTCTACGGTCTG<br>AMPC CAROFF-2:<br>GGGCAGCAAATGTGGAGCAA | 94°C 3 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>57°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 6 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo   | Caroff <i>et al.</i> , 2000<br><br>(192 pb)     |
| <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub><br>CMY-2-F: GATTCCTTGGACTCTTCAG<br>CMY-2-R: TAAAACCAGGTTCCCAGATAGC                 | 95°C 3 min. 1 ciclo<br>95°C 30 seg.<br>53°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 30 seg.<br>72°C 3 min. 1 ciclo | Stapleton <i>et al.</i> , 1999<br><br>(1807 pb) |
| <i>qnrA</i><br>QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG<br>QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC                                  | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 1 min.<br>55°C 1 min. 40 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo    | Cattoir <i>et al.</i> , 2008<br><br>(580 pb)    |
| <i>qnrB</i><br>QnrB-F: GGMATHGAAATTCGCCACTG<br>QnrB-R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA                                    | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 1 min.<br>56°C 1 min. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo    | Cattoir <i>et al.</i> , 2008<br><br>(264 pb)    |
| <i>qnrS</i><br>QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT<br>QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG                                 | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 1 min.<br>55°C 1 min. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo    | Cattoir <i>et al.</i> , 2008<br><br>(550 pb)    |

|   |  |   |
|---|--|---|
| <b><i>aac(6')-Ib</i></b><br>aac(6')-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA<br>aac(6')-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 45 seg.<br>60°C 45 seg. 20 ciclos<br>72°C 45 seg.<br>72°C 5 min. 1 ciclo | Park <i>et al.</i> , 2006<br><br>(482 pb)                       |
| <b><i>qepA</i></b><br>QepA-Fnew: GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG<br>QepA-R: CAACTGCTTGAGCCCGTAG                    | 96°C 1 min. 1 ciclo<br>96°C 1 min.<br>60°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 5 min. 1 ciclo    | Yamane <i>et al.</i> ,<br>2007<br><br>(617)                     |
| <b><i>oqxA</i></b><br>OqxA-F: CTCGGCGCGATGATGCT<br>OqxA-R: CCACTCTTCACGGGAGACGA                         | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 15 seg.<br>45°C 30 seg. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo  | Kim <i>et al.</i> , 2009<br><br>(392 pb)                        |
| <b><i>oqxB</i></b><br>OqxB-F: TTCTCCCCGGCGGGAAGTAC<br>OqxB-R: CTCGGCCATTTTGGCGCGTA                      | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 45 seg.<br>64°C 45 seg. 32 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo  | Kim <i>et al.</i> , 2009<br><br>(512 pb)                        |
| <b><i>gyrA</i></b><br>GyrA-F: TACACCGGTCAACATTGAGG<br>GyrA-R: TTAATGATTGCCGCCGTCGG                      | 92°C 3 min. 1 ciclo<br>92°C 25 seg.<br>64°C 1 min. 32 ciclos<br>74°C 2.5 min.<br>72°C 3 min. 1 ciclo | Ruiz <i>et al.</i> , 2012<br><br>(648 pb)                       |
| <b><i>parC</i></b><br>ParC-F: AAACCTGTTCAGCGCCGCATT<br>ParC-R: GTGGTGCCGTTAAGCAAA                       | 94°C 3 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>55°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 3 min. 1 ciclo    | Ruiz <i>et al.</i> , 2012<br><br>(395 pb)                       |
| <b><i>aac(3')-II</i></b><br>aac(3')-II-F: ACTGTGATGGGATACGCGTC<br>aac(3')-II-R: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA    | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>60°C 45 seg. 32 ciclos<br>72°C 2 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo  | Van de Klundert<br>and<br>Vliegenthart,<br>1993<br><br>(237 pb) |
| <b><i>aadA</i></b><br>aadA1: GCAGCGCAATGACATTCTTG<br>aadA2: ATCCTTCGGCGCGATTTTG                         | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>60°C 1 min. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo    | Madsen <i>et al.</i> ,<br>2000<br><br>(282 pb)                  |
| <b><i>sul-1</i></b><br>sul-1-F: TGGTGACGGTGTTCGGCATTG<br>sul-1-R: GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG                  | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>63°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo  | Mazel <i>et al.</i> ,<br>2000<br><br>(789 pb)                   |
| <b><i>sul-3</i></b><br>sul-3-F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG  | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>51°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.                           | Ruiz <i>et al.</i> ,<br>2012; Perreten<br>and Boerlin,<br>2003  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| sul-3-R:<br>CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA   | 72°C 5 min. 1 ciclo  | (990)  |
| <b>tet(A)</b><br>TETA-1: GTAATTCTGAGCACTGTTCGC<br>TETA-2: CTGCCTGGACAACATTGCTT                      | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 30 seg.<br>62°C 30 seg. 23 ciclos<br>72°C 45 seg.<br>72°C 7 min. 1 ciclo | Guardabassi <i>et al.</i> , 2000<br>(937 pb) |
| <b>tet(B)</b><br>TETB-1: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG<br>TETB-2: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT                       | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 30 seg.<br>57°C 30 seg. 25 ciclos<br>72°C 20 seg.<br>72°C 7 min. 1 ciclo | Guardabassi <i>et al.</i> , 2000<br>(416 pb) |
| <b>drfA</b><br>drfA-F: GTGAAACTATCACTAATGG<br>drfA-R: TTAACCCTTTTGCCAGATTT                          | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>95°C 1 min.<br>55°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo    | Navia <i>et al.</i> , 2003<br>(474 pb)       |
| <b>cmlA</b><br>CmlA-F: TGTCATTTACGGCATACTCG<br>CmlA-R: ATCAGGCATCCCATTCCCAT                         | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>55°C 1 min. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo    | Sáenz <i>et al.</i> , 2004<br>(455 pb)       |
| <b>intI1</b><br>IntI1-F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG<br>IntI1-R: CGACGATGATTTACACGCATGT                  | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>62°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo  | Mazel <i>et al.</i> , 2000<br>(483 pb)       |
| <b>intI2</b><br>IntI2-F: CACGGATATGCGACAAAAGGT<br>IntI2-R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG                   | 95°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>62°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo  | Mazel <i>et al.</i> , 2000<br>(788 pb)       |
| <b>rv-1</b><br>rvIntI1-F: GGCATCCAAGCAGCAAG<br>rvIntI1-R: AAGCAGACTTGACCTGA                         | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>55°C 1 min. 35 ciclos<br>65°C 8 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo    | Levesque and Roy, 1993<br>(variable)         |
| <b>rv-2</b><br>rvIntI2-F: GATGCCATCGCAAGTACGAG<br>rvIntI2-R:<br>CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA      | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 1 min.<br>60°C 1 min. 35 ciclos<br>65°C 6 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo    | White <i>et al.</i> , 2001<br>(variable)     |
| <b>Región conservada 3'-cs</b><br>qacΔ1-F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG<br>sul-1-R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG | 94°C 5 min. 1 ciclo<br>94°C 30 seg.<br>62°C 30 seg. 30 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 8 min. 1 ciclo  | Mazel <i>et al.</i> , 2000<br>(287 pb)       |

Las reacciones de PCR se realizaron en los siguientes termocicladores: Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems), T3 y T3000 thermocycler (Biometra), T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) y Multigene™ Mini.

Los reactivos y las concentraciones empleados en ésta técnica se detallan a continuación:

**Tabla 8.** Componentes y cantidades utilizados en cada PCR.

| Componente (distribuidor)                    | Concentración stock | Volumen por tubo | Concentración final de reacción |
|--|---------------------|------------------|---------------------------------|
| Oligonucleótido “forward” (Sigma)            | 25 µM               | 1 µl             | 0.5 µM                          |
| Oligonucleótido “reverse” (Sigma)            | 25 µM               | 1 µl             | 0.5 µM                          |
| BIOTAQ™DNA Polimerasa (Bioline)              | 5 U/µl              | 0.3 µl           | 1.5 U                           |
| Tampón de reacción NH <sub>4</sub> (Bioline) | 10 X                | 5 µl             | 1 X                             |
| MgCl <sub>2</sub> (Bioline)                  | 50 mM               | 1.5 µl           | 1.5 mM                          |
| dNTPs mix (Sigma Aldrich)                    | 2,5 mM              | 1 µl             | 0.05 mM                         |
| DNA  | ---                 | 10 µl            | 6                               |
| Agua miliQ estéril                           | ---                 | 30.2µl           | ---                             |
|  |                     | 50 µl            |                                 |

**Nota:** En el caso de las PCR múltiplex la cantidad de oligonucleótido extra añadido fue restado del volumen de agua, conservando así el volumen final requerido.

La concentración final de DNA fue calculada a partir de una medición estándar de 300 ng/µl.

### 7.3 Visualización de los productos de PCR

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa (Invitrogen®) al 1% (aunque cuando el producto esperado era menor a 500 pb se usaron geles al 1.5 o al 2% de agarosa) en una cámara de electroforesis con TAE 1X, a 90 Voltios durante 1 hora (generalmente) junto con un marcador de peso molecular (O’ GeneRuler®). Posteriormente los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio (BET) (Ethidium Bromide, Sigma®, 10mg/ml), 0.5 g/L durante 30 seg y se lavaron en agua destilada durante 1 min. Posteriormente, los geles se visualizaron y digitalizaron con ayuda de un fotodocumentador (MiniBIS Pro).

#### 7.4 Purificación de los productos de PCR

Algunos productos de PCR fueron purificados previamente a su secuenciación, con ayuda del kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit”. Ver anexo 2.

#### 7.5 Secuenciación

Esta técnica fue requerida en todos los productos de PCR obtenidos para:

- a) Determinar la variante alélica de genes de resistencia.
- b) Detectar las mutaciones en genes cromosómicos involucrados en la resistencia a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas.
- c) Estudiar la región variable de integrones clase 1 y 2.
- d) Tipificar los linajes genéticos de las cepas mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST)
- e) Determinar la variante alélica del gen *fimH* en las *E. coli* ST131.

Los productos amplificados se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM y a la empresa Cogenics (Takeley, Reino Unido), mediante la colaboración con la Dra. Carmen Torres Manrique de la Universidad de la Rioja, Logroño, España.

#### 7.6 Análisis de secuencias

Las secuencias recibidas se visualizaron con el programa Finch TV versión 1.4.0 Geospiza (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) y se analizaron con ayuda de las siguientes herramientas informáticas:

- Formateo en: <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>).
- El análisis de las secuencias se llevó a cabo por comparación con aquellas incluidas en la base de datos del GenBank: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- Los alineamientos se realizaron en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.
- La traducción aminoacídica en: <http://molbiol-tools.ca/>.

- La determinación de las diferentes variables alélicas de genes de  $\beta$ -lactamasas y genes *qnr*, además de la base GenBank, se llevó a cabo mediante el sitio web de la fundación Lahey Clinic Foundation <http://lahey.org/studies> y en <http://www.lahey.org/qnrStudies>, respectivamente.
- El estudio de las secuencias tipo (ST) de las cepas se efectuó a través de la base de datos MLST Database de la Universidad de Warwick en: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>

## **8. Tipado molecular**

La estructura poblacional de cada grupo de cepas se analizó mediante la determinación del grupo filogenético, la comparación de patrones de digestión obtenidos por electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE) y la determinación de la secuencia tipo (ST) y el complejo clonal (ST Cplx) mediante *multilocus sequence typing* (MLST).

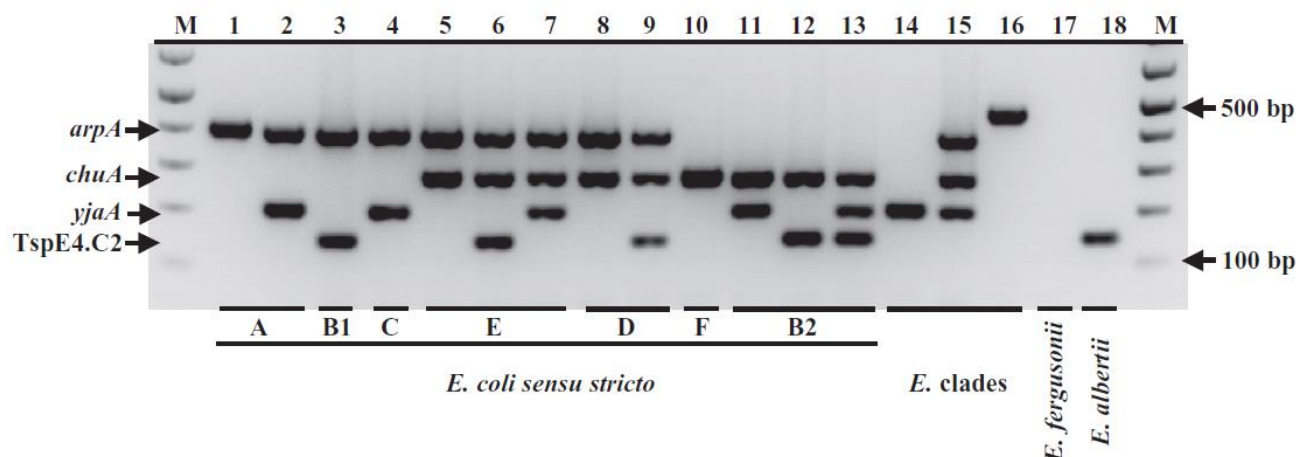
### **8.1 Determinación de filogrupos**

Todos los aislados fueron clasificados en alguno de los grupos filogenéticos de acuerdo a la metodología descrita por Clermont y colaboradores (Clermont *et al.*, 2013), que se basa en la detección de los genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* y el fragmento TspE4.C2 mediante una PCR cuádruplex y dos simplex (Tabla 9).

**Tabla 9.** Secuencia de oligonucleótidos y tamaños de los productos esperados en cada PCR (Clermont *et al.*, 2013).

| Reacción de PCR | Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3')   | Condiciones de amplificación  | Tamaño (pb) |
|-----------------|--|---|-------------|
| Cuádruplex      | <b><i>chuA</i></b><br>chuA.1b: ATGGTACCGGACGAACCAAC<br>chuA.2: TGCCGCCAGTACCAAAGACA                    | 94°C 4 min. 1 ciclo<br>94°C 5 seg.<br>59°C 20 seg. 30 ciclos<br>72°C 30 seg.<br>72°C 5 min. 1 ciclo | 288         |
|                 | <b><i>yjaA</i></b><br>yjaA.1b: CAAACGTGAAGTGTCAGGAG<br>yjaA.2b: AATGCGTTCCTCAACCTGTG                   |   | 211         |
|                 | <b>TspE4.C2</b><br>TspE4C2.1b:<br>CACTATTCGTAAGGTCATCC<br>TspE4C2.2b:<br>AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC         |   | 152         |
|                 | <b><i>arpa</i></b><br>AceK.f: AACGCTATTCGCCAGCTTGC<br>ArpA1.r: TCTCCCATACCGTACGCTA                     |   | 400         |
| Grupo E         | <b><i>arpa</i></b><br>ArpAgpE.f:<br>GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC<br>ArpAgpE.r:<br>GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG | 94°C 4 min. 1 ciclo<br>94°C 5 seg.<br>57°C 20 seg. 30 ciclos<br>72°C 30 seg.<br>72°C 5 min. 1 ciclo | 301         |
| Grupo C         | <b><i>trpA</i></b><br>trpAgpC.1:<br>AGTTTTATGCCAGTGCGAG<br>trpAgpC.2: TCTGCGCCGGTCACGCCC               | 94°C 4 min. 1 ciclo<br>94°C 5 seg.<br>59°C 20 seg. 30 ciclos<br>72°C 30 seg.<br>72°C 5 min. 1 ciclo | 219         |
| Control interno | <b><i>trpA</i></b><br>trpBA.f: CGGCGATAAAGACATCTTCAC<br>trpBA.r: GCAACGCGGCCTGGCGGAAG                  | (usados en PCR grupo E y C)   | 489         |

El método se inició con la obtención de los amplificadores descritos en la PCR cuádruplex (Figura 3), en caso de que con esta reacción no se definiera el filogrupo, se procedió a realizar las PCR específicas para los grupos E o C (Tabla 9).



**Figura 3.** Amplificados esperados en la PCR cuádruplex y filogrupo asignado. Carril 1, grupo A (REL606, + - - -); 2, grupo A (K-12 MG1655, + - + -); 3, grupo B1 (IAI1, + - - +); 4, grupo C (ECOR70, + - + -); 5, grupo E (EDL933, + + - -); 6, grupo E (ECOR31, + + - +); 7, grupo E (E101, + + + -); 8, grupo D (UMN026, + + - -); 9, grupo D (Py199, + + - +); 10, grupo F (IAI39, - + - -); 11, grupo B2 (ECOR60, - + + -); 12, grupo B2 (IAI53, - + - +); 13, grupo B2 (ED1a, - + + +); grupo 14, *Escherichia* clado I (M863, - - + -); 15, *Escherichia* clado I (IAI32, + + + -); 16, *Escherichia* clado V [E1118, (476)- - - -], la banda adiconal de (476 pb) corresponde a la amplificación de *chuA* con los oligonucleótidos *chuA2* y *AceK.f*; 17, *Escherichia fergusonii* (ATCC35469, - - - -); 18, *Escherichia albertii* (TW07627, - - - +). M, marcador de peso molecular. Tomada de Clermont *et al.*, 2013.

**Nota:** las cantidades de reactivos utilizadas en cada reacción son las indicadas en la tabla 8.

Finalmente, a cada *E. coli* se asignó un grupo filogenético con base a la combinación de amplificados que se detalla en la tabla 10.

Para esta metodología no se contó con controles positivos, por lo que los tamaños de cada amplificado se determinó comparando con un marcador de peso molecular (O' GeneRuler®, rango de 100 a 3000 pb).



**Tabla 10.** Genotipo de la PCR cuádruplex y asignación de filogrupo a los aislados de *E. coli*. (Clermont *et al.*, 2013).

| Genotipo (PCR cuádruplex) |                     |                     |                      | Filogrupo         | Procedimiento  |
|---------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--|
| arpA<br>(400<br>pb)       | chuA<br>(288<br>pb) | yjaA<br>(211<br>pb) | TspE4.C2<br>(152 pb) |                   |  |
| +                         | -                   | -                   | -                    | A                 |  |
| +                         | -                   | -                   | +                    | B1                |  |
| -                         | +                   | -                   | -                    | F                 |  |
| -                         | +                   | +                   | -                    | B2                |  |
| -                         | +                   | +                   | +                    | B2                |  |
| -                         | +                   | -                   | +                    | B2                | Debe ser confirmado con la búsqueda del gen <i>ibeA</i> <sup>a</sup>   |
| +                         | -                   | +                   | -                    | A o C             | Usar primers específicos para C, si es C+ es C, sino A   |
| +                         | +                   | -                   | -                    | D o E             | Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D   |
| +                         | +                   | -                   | +                    | D o E             | Usar primers específicos para E, si es E+ es E, sino D   |
| +                         | +                   | +                   | -                    | E o clado I       | Usar primers específicos para E, si es E-, es clado I, confirmar usando primers de clado críptico <sup>b</sup>                                       |
| -                         | -                   | +                   | -                    | Clado I o II      | Confirmar usando primers de clado críptico <sup>b</sup>  |
| -                         | (476) <sup>c</sup>  | -                   | -                    | Clado III, IV o V | Confirmar usando primers de clado críptico <sup>b</sup>  |
| -                         | -                   | -                   | +                    | Desconocido       | Realizar MLST  |
| -                         | -                   | +                   | +                    | Desconocido       | Realizar MLST  |
| +                         | -                   | +                   | +                    | Desconocido       | Realizar MLST  |
| +                         | +                   | +                   | +                    | Desconocido       | Realizar MLST  |
| -                         | -                   | -                   | -                    | Desconocido       | Confirmar identificación de <i>E. coli</i> con primers <i>uidA</i> , si es positivo confirmar usando primers de clado críptico <sup>b</sup> y/o MLST |

<sup>a</sup>: Gordon y colaboradores (2008).

<sup>b</sup>: Clermont y colaboradores (2011b).

<sup>c</sup>: La PCR cuádruplex resultará con un producto de 476 pb en aquellas cepas que pertenezcan a los clados crípticos III, IV o V. Si esto ocurre, se deberá hacer la detección del clado críptico usando los primers correspondientes (Clermont *et al.*, 2011b)

## 8.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Esta técnica se utilizó para determinar la relación poblacional de las cepas en base a un patrón de restricción generado por la endonucleasa *XbaI*.

Se siguió el protocolo propuesto por Gautom y colaboradores (Gautom *et al.*, 1997), brevemente modificado (Ruiz *et al.*, 2012). Ver anexo 2.

### *Análisis de los patrones PFGE-XbaI:*

Los patrones de digestión fueron inicialmente analizados siguiendo los criterios sugeridos por Tenover y colaboradores, de tal manera que se asignó la misma letra (A-Z) cuando el patrón entre los aislados coincidía, o subíndices numéricos (A<sub>1</sub>-Z<sub>1</sub>) cuando había ciertas diferencias (subtipo: de 2 a 3 diferencias), mismas que se indican en la tabla número 11 (Tenover *et al.*, 1995). Posteriormente, se efectuó el análisis de las imágenes de los geles mediante el programa informático Gel Quant Express, con el que se obtuvo la matriz de datos correspondiente. Los patrones de digestión fueron clasificados mediante un análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice y el método “Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages” (UPGMA) a través del software NTSYSpc 2.21q, para finalmente generar un dendograma de agrupación y asignar un pulsotipo (PT).

**Tabla 11.** Criterios para el análisis de patrones PFGE-*XbaI* (Tenover *et al.*, 1995).

| Categoría                | No. de diferencias genéticas comparadas con la cepa líder <sup>a</sup> | Típico No. de fragmentos diferentes comparados con el patrón de la cepa líder | Interpretación epidemiológica                 |
|--------------------------|--|---|---|
| Indistinguible           | 0  | 0   | El aislado es parte de un brote               |
| Cercanamente relacionada | 1  | 2-3   | El aislado es probablemente parte de un brote |
| Posiblemente relacionada | 2  | 4-6   | El aislado es posiblemente parte de un brote  |
| Diferente                | ≥3   | ≥7  | El aislado no es parte de un brote            |

<sup>a</sup>: cepa que presenta el patrón de bandeo más común entre los aislados evaluados.

### 8.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Mediante esta técnica se determinó la relación clonal de las cepas en estudio al amplificar y secuenciar genes de mantenimiento constitutivos o “housekeeping”, que presentan mayor similitud y cercanía evolutiva. La secuenciación permite la identificación de un número de alelo para cada gen, de modo que la combinación de todos ellos conlleva a la asignación de un número de secuencia tipo (ST) y de ser posible, las incluye en un grupo clonal (ST Cplx) con otros ST relacionados. Esta técnica permite la comparación de cepas bacterianas independientemente del momento y lugar en el que sean aisladas. Los genes constitutivos a analizar así como los oligonucleótidos empleados en cada PCR varían en función del microorganismo a estudiar. Las especies bacterianas y los protocolos para el tipado por MLST de las mismas que se han desarrollado hasta el momento, se encuentran disponibles en la página web <http://pubmlst.org>. El tipado de *E. coli* por MLST se realizó con la información disponible en <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>, que permite analizar la secuencia nucleotídica de 7 genes de mantenimiento altamente conservados en esta bacteria: *adk* (adenilato quinasa), *fumC* (fumarato hidratasa), *gyrB* (DNA girasa), *icd* (isocitrato/isopropilmalato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *purA* (adenilosuccinato deshidrogenasa) y *recA* (motivo de unión de ATP/GTP).

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación y las condiciones de PCR se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Secuencia de oligonucleótidos y condiciones de amplificación utilizados en el tipado de *E. coli* mediante MLST (Tartof *et al.*, 2005).

| Gen         | Oligonucleótidos (5' - 3')           | Temperatura de alineamiento <sup>a</sup> | Tamaño (pb) |
|-------------|--------------------------------------|--|-------------|
| <i>adk</i>  | adk-F: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG          | 54                                       | 583         |
|             | adk-R: CCGTCAACTTTCGCGTATTT          |  |             |
| <i>fumC</i> | fumC-F: TCACAGGTGCCAGCGCTTC          | 54                                       | 806         |
|             | fumC-R: GTACGCAGCGAAAAAGATTC         |  |             |
| <i>icd</i>  | icd-F: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA | 54                                       | 878         |
|             | icd-R: GGACGCAGCAGGATCTGTT           |  |             |
| <i>purA</i> | purA-F: CGCGCTGATGAAAGAGATGA         | 54                                       | 816         |
|             | purA-R: CATA CGGTAAGCCACGCAGA        |  |             |
| <i>gyrB</i> | gyrB-F: TCGGCGACACGGATGACGGC         | 60                                       | 880         |
|             | gyrB-R: ATCAGGCCTTCACGCGCATC         |  |             |
| <i>recA</i> | recA-F: CGCATTCGCTTTACCCTGACC        | 60                                       | 734         |
|             | recA-R: TCGTCGAAATCTACGGACCGGA       |  |             |
| <i>mdh</i>  | mdh-F:                               | 60                                       | 932         |
|             | ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG     |  |             |
|             | mdh-R:                               |  |             |
|             | TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT  |  |             |

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (95°C, 3 min); 30 ciclos (95°C, 1 min; <sup>a</sup>, 1 min y 72°C, 2 min) y extensión final (72°C, 5 min).

<sup>a</sup>: temperatura de alineamiento para cada reacción de PCR.

#### 8.4 Caracterización de *E. coli* ST131

A las cepas que resultaron pertenecer al grupo clonal ST131 se les determinó la variante alélica del gen *fimH*, que codifica para la adhesina fimbrial tipo 1 y que está relacionada con la resistencia a fluoroquinolonas.

También se les identificaron las variantes de los antígenos somático (O) y flagelar (H).

##### 8.4.1 Subtipificación con el gen *fimH*

Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 13.** Oligonucleótidos y condiciones de reacción utilizados en la amplificación del gen *fimH* (Weissman *et al.*, 2012).

| Oligonucleótidos (Secuencia 5' - 3') | Condiciones de amplificación | Tamaño (pb)              |
|--------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>fimH</i>                          | 94°C 5 min. 1 ciclo          | Batchelor, et. al., 2005 |
| FimH-F: CACTCAGGGAACCATTCAGGCA       | 94°C 30 seg.                 |                          |
| FimH-R: CTTATTGATAAACAAAAGTCAC       | 57°C 15 seg. 30 ciclos       | 975 pb                   |
|                                      | 72°C 1 min.                  |                          |
|                                      | 72°C 5 min. 1 ciclo          |                          |

El producto de PCR se purificó y se envió a secuenciar. La secuencia de nucleótidos fue comparada con la base de datos provista por el grupo de trabajo de Weissman y colaboradores (alineando con BioNumerics).

#### 8.4.2 Serotipificación

Los aislados ST131 fueron tipificados mediante la determinación de los antígenos O (somático) y H (flagelar), usando sueros de referencia (Statens Serum Institut). Esta parte metodológica se realizó en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, por la colaboración con el Dr. Armando Navarro. Las cepas fueron serotipificadas mediante ensayos de aglutinación (Ørskov and Ørskov, 1984) usando placas de microtitulación con 96 pozos y suero de conejo (SERUNAM), obtenido de 187 antígenos somáticos y 53 flagelares específicos para *E. coli*.

#### 9. Determinación de patotipos

A todas las cepas se les realizó la búsqueda de factores de virulencia correspondientes a 6 patotipos intestinales: ETEC, EPEC, EAEC, EHEC, DAEC y EIEC, tomando en consideración el origen de aislamiento de las mismas, ya que casi todas, excepto 3 de origen clínico, provenían del tracto intestinal.

La determinación se hizo mediante 3 PCR múltiplex, cuyos oligonucleótidos y condiciones de reacción se detallan a continuación:

**Tabla 14.** Secuencia de oligonucleótidos, determinantes de virulencia y condiciones de PCR utilizados en la determinación de patotipos intestinales (Gómez-Duarte *et al.*, 2010; Panchalingam *et al.*, 2012).

| Patotipo          | Oligonucleótidos (5' - 3')   | Determinante de virulencia detectado | Condiciones de amplificación  | Tamaño (pb)         |
|-------------------|--|--------------------------------------|---|---------------------|
| ETEC <sup>1</sup> | <i>elt</i><br>LT-F: CACACGGAGCTCCTCAGTC<br>LT-R: CCCCAGCCTAGCTTAGTTT                   | Enterotoxina termolábil              | 96°C 4 min. 1 ciclo<br>95°C 20 seg.<br>57°C 20 seg. 35 ciclos<br>72°C 1 min.<br>72°C 7 min. 1 ciclo | 508                 |
|                   | <i>est</i><br>ST-F: GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA<br>ST-R: CCCGGTACARGCAGGATTACAACA         | Enterotoxina termoestable            |   | 147                 |
| EPEC <sup>1</sup> | <i>bfpa</i><br>BFPA-F: GGAAGTCAAATTCATGGGGG<br>BFPA-R: GGAATCAGACGCAGACTGGT            | Pilus formador de mechones           |   | 367                 |
|                   | <i>eae</i><br>EAE-F: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC<br>EAE-R: CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG      | Intimina                             |   | 881                 |
|                   | <i>eae<sup>2</sup></i><br>EAE2-F: GACCCGGCACAAGCATAAGC<br>EAE2-R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG | Intimina                             |   | 384                 |
| EAEC <sup>1</sup> | <i>aatA</i><br>CVD432-F: CTGGCGAAAGACTGTATCAT<br>CVD432-R: CAATGTATAGAAATCCGCTGTT      | Proteína de membrana externa         |   | 630                 |
|                   | <i>aaiC</i><br>AAIC-F: ATTGTCCTCAGGCATTTTAC<br>AAIC-R: ACGACACCCCTGATAAACAA            | Locus de virulencia                  |   | 215                 |
| EHEC <sup>2</sup> | <i>ehxA</i><br>ehxA-F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC<br>ehxA-R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT         | Hemolisina A                         |   | 95°C 5 min. 1 ciclo |
|                   | <i>stx1</i><br>stx1-F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC<br>stx1-R: AGAACGCCCACTGAGATCATC        | Toxina Shiga                         | 95°C 20 seg.<br>55°C 45 seg. 35 ciclos<br>72°C 30 seg.  | 180                 |
|                   | <i>stx2</i><br>stx2-F: GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC<br>stx2-R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG         | Toxina Shiga                         | 72°C 7 min. 1 ciclo   | 255                 |
| DAEC <sup>3</sup> | <i>daaE</i><br>daaE-F: GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA<br>daaE-R: TATTCACCGGTCGGTTATCAGT       | Fimbria                              | 94°C 2 min. 1 ciclo<br>92°C 30 seg.<br>59°C 30 seg. 40 ciclos                                       | 542                 |
| EIEC <sup>3</sup> | <i>ipaH</i><br>ipaH-F: CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG<br>ipaH-R: GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC      | Proteína de invasión                 | 72°C 30 seg.<br>72°C 5 min. 1 ciclo   | 933                 |

<sup>1</sup>: Multiplex 1; <sup>2</sup>: Multiplex 2; <sup>3</sup>: Multiplex 3

## 10. Transferencia genética

### 10.1 Conjugación

Con la finalidad de evaluar la transferencia horizontal de determinantes de resistencia en cepas seleccionadas (elegidas con base al perfil de patrones PFGE-*XbaI* y al contenido génico de resistencia), se llevaron a cabo ensayos de conjugación, con el procedimiento que se detalla en el anexo 2.

Una vez seleccionadas las posibles transconjugantes, se procedió a verificarlas, para ello se realizó un perfil plasmídico común y posteriormente se determinó el perfil de restricción mediante PFGE-*XbaI*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 8.2. Se incluyeron como cepas de referencia a la cepa donadora y receptora en el mismo gel, con el entendido de que si no eran transconjugantes, el patrón de bandeo de la posible transconjugante debía ser muy similar, sino es que idéntico, al de la cepa donadora. Mientras que en el caso de serlo, el patrón de restricción debía ser similar ó al menos muy parecido al de la cepa receptora, tomando en cuenta la influencia de los posibles eventos genéticos descritos en los criterios por Tenover y colaboradores (mutaciones, inserciones o deleciones de ADN) (Tenover *et al.*, 1995), mismos que pudieran alterar el patrón esperado.

Aquellas cepas que fueron consideradas transconjugantes mediante este criterio de selección, se caracterizaron detectando los mecanismos de resistencia y plásmidos que habían sido transferidos, empleando las mismas técnicas que habían sido utilizadas en la caracterización de las cepas donadoras. Es decir, se analizó la sensibilidad a antibióticos en las cepas transconjugantes respecto a su respectiva receptora mediante Kirby-Bauer, se determinó la producción fenotípica de BLEE y se realizó la búsqueda de genes de resistencia como consecuencia de su adquisición mediada por elementos genéticos móviles, incluyendo plásmidos.

Para tal efecto se procedió a realizar la caracterización plasmídica.

## 11. Caracterización plasmídica

Una vez que se puso en evidencia la transferencia horizontal de genes de resistencia en las cepas estudiadas, se procedió a determinar el tipo de replicón, el número y el tamaño de los plásmidos involucrados, así como la presencia de sistemas de adicción, tanto en las cepas donadoras como en sus transconjugantes.

### 11.1 Tipado de plásmidos por “PCR-based replicon typing” (PBRT)

Este método descrito por Carattoli y colaboradores, se basa en el tipado de plásmidos mediante la amplificación por PCR de replicones pertenecientes a los grupos de incompatibilidad (Inc) reportados por Carattoli y colaboradores para enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005a). Esta técnica contempla la realización de 5 PCR múltiplex y 3 PCR simplex con los oligonucleótidos y condiciones que se describen en la tabla 15.

También se realizó la búsqueda de otros replicones no considerados en la metodología anterior, que fueron identificados posteriormente, como IncT, IncU y el plásmido oricolE; cuyos oligonucleótidos también se muestran en la siguiente tabla (García-Fernández *et al.*, 2009).

**Tabla 15.** Oligonucleótidos utilizados en el método PBRT para el tipado de plásmidos (Carattoli *et al.*, 2005a; García-Fernández *et al.*, 2009).

| Replicón             | Oligonucleótidos (5' - 3')   | Sitio blanco | Tamaño (pb) |
|----------------------|--|--------------|-------------|
| IncHI1 <sup>a</sup>  | F: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC<br>R: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA               | parA-parB    | 471         |
| IncHI2 <sup>a</sup>  | F: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC<br>R: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT            | Iterones     | 644         |
| IncI1 <sup>a</sup>   | F: CGAAAGCCGGACGGCAGAA<br>R: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT                   | RNAI         | 139         |
| IncX <sup>b</sup>    | F: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT<br>R: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC | ori $\gamma$ | 376         |
| IncL/M <sup>a</sup>  | F: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG<br>R: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG              | repA,B,C     | 785         |
| IncIncN <sup>a</sup> | F: GTCTAACGAGCTTACCGAAG<br>R: GTTTCAACTCTGCCAAGTTC                   | repA         | 559         |
| IncFIA <sup>c</sup>  | F: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG<br>R: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG            | Iterones     | 462         |
| IncFIB <sup>c</sup>  | F: TCTGTTTATTCTTTTACTGTCCAC<br>R: CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT              | repA         | 702         |
| IncW <sup>c</sup>    | F: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG  | repA         | 242         |



|                                   |   |                 |     |
|-----------------------------------|---|-----------------|-----|
|                                   | R: GGTGCGCGGCATAGAACCGT                                       |                 |     |
| IncY <sup>d</sup>                 | F: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG<br>R: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT | repA            | 765 |
| IncP <sup>d</sup>                 | F: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA<br>R: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC      | Iterones        | 534 |
| IncFIC <sup>d</sup>               | F: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG<br>R: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT       | repA2           | 262 |
| IncA/C <sup>e</sup>               | F: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA<br>R: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT    | repA            | 465 |
| IncT <sup>e</sup>                 | F: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT<br>R: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC    | repA            | 750 |
| IncF <sub>repB</sub> <sup>e</sup> | F: TGATCGTTTAAGGAATTTTG<br>R: GAAGATCAGTCACACCATCC            | RNAI/repA       | 270 |
| IncFII <sub>S</sub> <sup>1</sup>  | F: CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC<br>R: CAGTCACTTCTGCCTGCAC           | repA            | 270 |
| IncK <sup>2</sup>                 | F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC<br>R: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA           | RNAI            | 160 |
| IncB/O <sup>3</sup>               | F: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC<br>R: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA          | RNAI            | 159 |
| IncR                              | F: TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC<br>R: GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA          | Plásmido R      | 251 |
| IncU                              | F: TCACGACACAAGCGCAAGGG<br>R: TCATGGTACATCTGGGCGC             | Plásmido U      | 843 |
| oricolE                           | F: GTTCGTGCATACAGTCCA<br>R: GGCGAAACCCGACAGGACT               | Plásmido colE   | 187 |
| oricolE <sub>TP</sub>             | F: GTTCGTGCATACAGTCCA<br>R: GGTTTACCGGTGTCATTCC               | Plásmido ColETp | 106 |

<sup>a</sup>: Multiplex 1; <sup>b</sup>: Multiplex 2; <sup>c</sup>: Multiplex 3; <sup>d</sup>: Multiplex 4; <sup>e</sup>: Multiplex 5.

<sup>1</sup>: Simplex 1; <sup>2</sup>: Simplex 2; <sup>3</sup>: Simplex 3.

Para todas las PCR las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 1 min; 60°C, 30 seg y 72°C, 1 min) y extensión final (72°C, 5 min). En el caso de la PCR simplex 1 la temperatura de alineamiento fue de 54°C (en lugar de 60°C).

Los reactivos y las concentraciones de los componentes empleados en ésta técnica se detallan a continuación:

**Tabla 16.** Componentes utilizados en cada PCR para la determinación de replicones plasmídicos.

| Componente (distribuidor) <sup>a</sup>        | Concentración stock | Volumen por tubo | Concentración final de reacción |
|---|---------------------|------------------|---------------------------------|
| Oligonucleótido “forward” (Sigma)             | 25 $\mu$ M          | 0.3 $\mu$ l      | 0.75 $\mu$ M                    |
| Oligonucleótido “reverse” (Sigma)             | 25 $\mu$ M          | 0.3 $\mu$ l      | 0.75 $\mu$ M                    |
| BIOTAQ <sup>TM</sup> DNA Polimerasa (Bioline) | 5 U/ $\mu$ l        | 0.1 $\mu$ l      | 0.5 U                           |
| Buffer 10X (Bioline)                          | 10 X                | 1 $\mu$ l        | 1 X                             |
| MgCl <sub>2</sub> (Bioline)                   | 25 mM               | 1 $\mu$ l        | 2.5 mM                          |
| dNTPs mix (Sigma Aldrich)                     | 10 mM               | 0.4 $\mu$ l      | 0.4 mM                          |
| DNA <sup>b</sup>                              | ---                 | 0.3 $\mu$ l      | ---                             |
| Agua miliQ estéril                            | ---                 | 5.9 $\mu$ l      | ---                             |
|   |                     | 10 $\mu$ l       |                                 |

<sup>a</sup>: cantidades usadas en un PCR simplex. En el caso de las PCR múltiplex, la cantidad de oligonucleótido extra añadido fue restado del volumen de agua, conservando así el volumen final requerido.

<sup>b</sup>: se usó DNA total obtenido mediante el método de hervido, o plasmídico obtenido con el kit comercial descrito en el apartado 5.2.1.

## 11.2 Determinación de número y tamaño de plásmidos

Se llevaron a cabo ensayos de digestión con ADN total mediante la técnica PFGE y el uso de la nucleasa S1, con la finalidad de conocer el número y tamaño de los plásmidos presentes en las cepas donadoras y sus Tc. Se siguió el protocolo descrito en la sección 8.2, modificando la enzima, las cantidades de digestión y el tiempo de corrimiento electroforético, como se indica en el anexo 2.

El tamaño de los plásmidos fue estimado mediante un análisis estadístico. Se realizó una regresión lineal simple a través del método de mínimos cuadrados con el programa Statgraphics (Statgraphics 2010, Centurion XVI), este software diseñó un modelo matemático que calculó el

tamaño de cada plásmido en función de la distancia de migración que recorrió en el gel PFGE-S1 y comparándola con la del marcador de peso molecular (Ver anexo 4).

### 11.3 Sistemas de adicción plasmídicos

De igual manera se estudió por PCR la presencia de 8 sistemas de adicción:

- 5 sistemas proteicos antitoxina-regulados: PemK–PemI, codificado por el gen *pemKI* (plasmid emergency maintenance); CcdA–CcdB, gen *ccdAB* (coupled cell division locus); RelB–RelE, gen *relBE* (relaxed control of stable RNA synthesis); ParD–ParE, gen *parDE* (plásmido RK2) y VagC–VagD, gen *vapBC* (virulence-associated protein), también llamado *vagCD*.
- 3 sistemas RNA antisentido-regulados: Hok–Sok, gen *hok-sok* (host-killing system); PndA–PndC, gen *pndAC* (promotion of nucleic acid degradation) y SrnB–SrnC, codificado por el gen *srnBC* (stable RNA) (Mnif *et al.*, 2010).

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 17.** Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleados en la búsqueda de los sistemas de adicción plasmídicos (Mnif *et al.*, 2010).

| Gen            | Oligonucleótidos (5' - 3')                                     | Temperatura de alineamiento <sup>a</sup> | Tamaño (pb) |
|----------------|--|--|-------------|
| <i>pemKI</i>   | PemK-up: AACGAGAATGGCTGGATGC<br>PemK-low: CCAACGACACCGCAAAGC   | 54                                       | 232         |
| <i>ccdAB</i>   | CcdA-up: AGGAAGGGATGGCTGAGGT<br>CcdB-low: GGTAAGTTACGGGAGAC    | 54                                       | 230         |
| <i>relBE</i>   | RelE-up: AAAAACCCGATGGCGACAG<br>RelE-low: TGATAGACCAGGCGAAAAC  | 57                                       | 370         |
| <i>parDE</i>   | ParD-up: ACGGACCAGCAGCACCAG<br>ParE-low: AGCCCTTGAGCCTGTCCG    | 58                                       | 534         |
| <i>vagCD</i>   | VagC-up: GGGACCTGGATTTTGATGG<br>VagD-low: GAGCAGATGTTGGTGTCCG  | 53                                       | 210         |
| <i>hok-sok</i> | Hok-up: AGATAGCCCCGTAGTAAGTT<br>Sok-low: GATTTTCGTGTCAGATAAGTG | 54                                       | 203         |
| <i>pndAC</i>   | PndC-up: TCAATCAACCAGGGCTCT                                    | 52                                       | 140         |

|              |  |    |     |
|--------------|--|----|-----|
|              | PndA-low: CCTCACCATCCAGACAAAA                                    |    |     |
| <i>srnBC</i> | SrnB-up: ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT<br>SrnC-low: CACCACTGTATTTCCCCTGT | 54 | 171 |

Condiciones de amplificación: desnaturalización inicial (94°C, 5 min); 30 ciclos (94°C, 45 seg;<sup>a</sup>, 45 seg y 72°C, 45 seg) y extensión final (72°C, 5 min).

<sup>a</sup>: temperatura de alineamiento para cada reacción de PCR.

Las cantidades para cada PCR fueron las mismas que se detallan en la tabla 16.

## 12. Localización plasmídica de determinantes de resistencia

Con la finalidad de conocer la localización plasmídica o cromosómica de algunos determinantes de resistencia, así como para saber en qué tipo de plásmido se albergaron los genes de resistencia transferidos por conjugación, se procedió a determinar la localización de algunos determinantes de resistencia en las cepas donadoras y en las Tc mediante experimentos de hibridación.

### 12.1 Ensayos de hibridación

El proceso de hibridación se realizó utilizando un método radiactivo con <sup>32</sup>P, mismo que se describe a detalle en el anexo 2.

## RESULTADOS

Debido al comportamiento particular de cada grupo de cepas con respecto a la diversidad clonal, la variabilidad genética, y las características de los plásmidos involucrados en la resistencia, se procederá a presentar los resultados obtenidos y su respectiva discusión, de manera individual para cada hospedero en el siguiente orden:

1. Perros sanos
2. Tortugas
3. Portadores humanos
4. Pacientes pediátricos

### 1. PERROS SANOS

#### Resultados

De un total de 53 perros, el 17% (n= 9) fueron portadores de *E. coli* CTX<sup>R</sup>. Tres de los aislados mostraron producción fenotípica de BLEE, mientras que los 6 restantes fueron negativos a esta prueba, pero presentaron resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y/o cefoxitina (Tabla 18). Los 3 aislados BLEE positivos albergaron el gen que codifica para la BLEE CTX-M-15 (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) y 1 de ellos también presentó el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa SVH-2. Los 3 aislados fueron asignados al grupo filogenético A y a los ST617 (Cplx10), ST410 (Cplx23) y ST3944, respectivamente. Ningún patrón de restricción obtenido por PFGE estuvo relacionado (Figura 4). Los 3 aislados BLEE positivos presentaron genes de resistencia a fluoroquinolonas y a aminoglucósidos [genes *aac(6)-Ib-cr* ó *aac(3)-II*], así como otros genes que dan resistencia a diferentes agentes antimicrobianos (Tabla 18). Dos aislados albergaron integrones de clase 1, uno de ellos clásico (región 3' conservada: *qacE*  $\Delta$ 1-*sul1*) y con la estructura genética *dfr17-aadA5*; mientras que el otro careció de esta región conservada. Un integrón de clase 2 sólo fue detectado en la cepa C7204, con la estructura genética *dfrA12-sat2-aadA1*. Los aislados CTX<sup>R</sup> BLEE negativos presentaron resistencia a cefoxitina (cefalosporina de segunda generación) y a amoxicilina-ácido clavulánico; además albergaron el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa CMY-2 (*bla*<sub>CMY-2</sub>) (Tabla 19).

**Tabla 18.** Tipificación molecular, perfil de resistencia y estructura de integrones en las *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de muestras fecales de perros sanos.

| <i>E. coli</i> | Grupo filogenético | MLST                        |           | Fenotipo BLEE | Resistencia a AMC/FOX | Mutaciones en <i>ampC</i> | Resistencia a no β-lactámicos <sup>b</sup> | Integrones de clase 1    |                     | Integrones de clase 2 |                          |
|----------------|--------------------|-----------------------------|-----------|---------------|-----------------------|---------------------------|--|--------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|
|                |                    | ST/ST-Cplx                  | Pulsotipo |               |                       |                           |  | <i>intI1/qacEΔ1+sulI</i> | Estructura genética | <i>intI2</i>          | Estructura genética      |
| C7205          | A                  | 617/10                      | A         | +             | +/-                   | ND                        | CI, N, A, T, SXT, TE                       | +/+                      | drfA17-aadA5        | -                     | ND                       |
| C7206          | A                  | 410/23                      | B         | +             | -/-                   | ND                        | CI, N, T                                   | -/-                      | ND                  | -                     | ND                       |
| C7207          | A                  | 3944/Ninguno                | C         | +             | -/-                   | ND                        | CI, N, G, S, C, SXT, TE                    | +/-                      | ND                  | -                     | ND                       |
| C7203          | B1                 | 1431/N Ninguno              | D         | -             | +/+                   | -18, -1, +58              | CI, N, S, C, STX, TE                       | +/-                      | ND                  | -                     | ND                       |
| C7204          | D                  | 57/350                      | E         | -             | +/+                   | Wild                      | CI, N, G, A, S, T, SXT, TE                 | +/+                      | <i>aadA</i>         | +                     | <i>dfrA12-sat2-aadA1</i> |
| C7209          | D                  | 4565 <sup>a</sup> / Ninguno | F         | -             | +/+                   | -28, +58                  | -  | -/-                      | ND                  | -                     | ND                       |
| C7201          | D                  | ND                          | G         | -             | +/+                   | Wild                      | CI, N, G, S, T, C, SXT, TE                 | -/+                      | ND                  | -                     | ND                       |
| C7208          | A                  | 93/168                      | H         | -             | +/+                   | -32                       | CI, N, G, S, T, C, SXT, TE                 | +/+                      | <i>aadB-aadA1</i>   | -                     | ND                       |
| C7200          | A                  | ND                          | I         | -             | +/+                   | Wild                      | S, TE                                      | -/-                      | ND                  | -                     | -                        |

MLST, *multilocus sequence typing*; ST, secuencia tipo; Cplx, complejo clonal; ND, no determinado; PFGE, *pulsed-field gel electrophoresis*; BLEE, β-lactamasas de espectro extendido; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; FOX, cefoxitina; N, ácido nalidíxico; CI, ciprofloxacino; A, amikacina; G, gentamicina; T, tobramicina; S, estreptomycin; C, cloranfenicol; TM, trimetoprim; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; TE, tetraciclina.

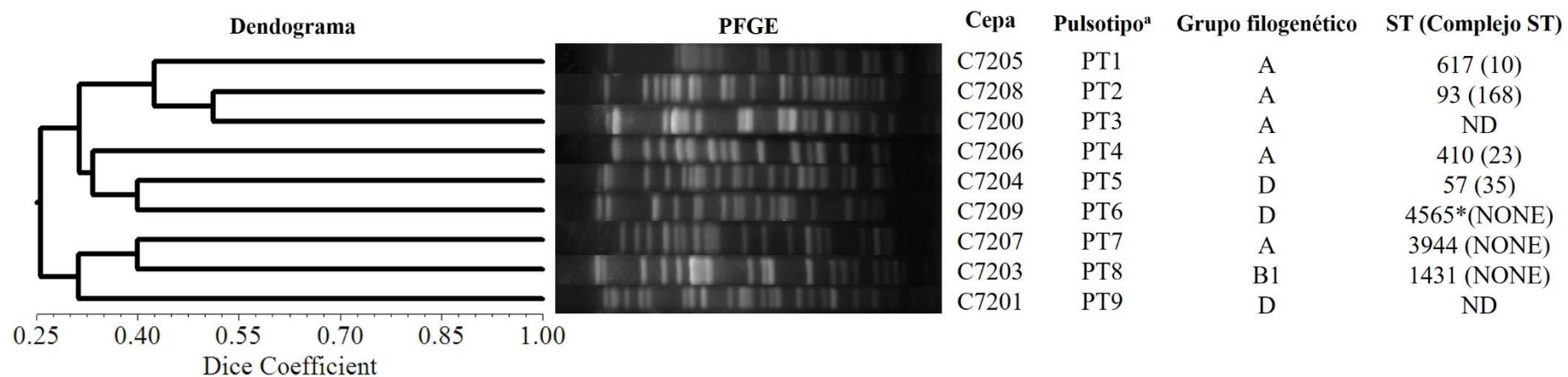
<sup>a</sup>Combinación of alelos para una nueva secuencia tipo: *adk* (348), *gyrB* (97), *icd* (29), *mdh* (70), *purA* (158), *recA* (2), and *fumC* (585-New): ST4565.

<sup>b</sup>Los puntos de corte para los agentes antimicrobianos se interpretaron de acuerdo al CLSI, 2015.

Estos aislados BLEE negativos fueron clasificados dentro de los grupos filogenéticos (número de aislados): A (n= 2), B1 (n= 1), D (n= 1), E (n= 1) y F (n=1); todos mostraron patrones PFGE no relacionados (Figura 4). Cuatro aislados tipificados por MLST pertenecieron a los ST1431, ST57, ST93 y al nuevo ST4565. El ST4565 al que perteneció la cepa C7209, resultó de la combinación alélica que incluyó una nueva variante del gen *fumC*, la variante 585, la cual ha sido registrada en la base de datos MLST para *E. coli* (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

La secuenciación de la región promotora-atenuadora del gen cromosomal *ampC* en 6 aislados CMY-2 positivos, indicó la presencia de mutaciones en 3 de ellas y la secuencia silvestre de esta región en las 3 restantes (Tabla 18). El aislado C7208 presentó un cambio en la posición -32, que ha sido asociada a la hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa AmpC, así como la presencia de un integrón de clase 1 con el casete génico *aadB-aadA1*; y en la cepa C7204 se identificaron integrones tanto de clase 1 (casete *aadA*) como de clase 2 (estructura *dfrA12-sat2-aadA1*) (Tabla 18); mientras que en los aislados C7201 y C72032 no se detectó algún arreglo genético y/o la secuencia 3' conservada; y en aislados C7200 y C7209 (también CMY-2 positivos), no se detectaron integrones. Otros genes de resistencia fueron identificados en las *E. coli* pAmpC positivas, incluyendo al gen *qnrB19* que da resistencia a quinolonas en la cepa C7203 (Tabla 19).

Se llevaron a cabo ensayos de conjugación para analizar la transferencia de genes de resistencia, obteniendo transconjugantes en 6 de las 9 cepas, en las que se pudo evidenciar la transferencia de la BLEE CTX-M-15 y la cefamicinasa CMY-2, así como la presencia de plásmidos de diferente tamaño (Tabla 19).



**Figura 4.** Dendrograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica-*XbaI* y tipado molecular de las *E. coli* CTX-R recuperadas de perros sanos.

<sup>a</sup>: Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice (valor > 85%).

\*: Combinación de alelos para la nueva secuencia tipo ST4565: *adk* (348), *gyrB* (97), *icd* (29), *mdh* (70), *purA* (158), *recA* (2), y *fumC* (585-nuevo).



**Tabla 19.** Genes de resistencia y determinantes plasmídicos localizados en las *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de perros.

| <i>E. coli</i> | $\beta$ -lactamasas  | Otros genes de resistencia     | Caracterización plasmídica    |  |  |
|----------------|--|--------------------------------|-------------------------------|--|--|
|                |  |                                | Replicón                      | Número: tamaño (kb)                                      | Sistemas de adición                        |
| <b>C7205</b>   | <u>CTX-M-15</u> <sup>a</sup>                                     | <i>aac(6')-lb-cr, tet(B)</i>   | <b>FIB</b> , Frep,            | 2: 45, <b>150</b> <sup>a</sup>                           | <i>pemkI, ccdAB, vagCD, srnBC</i>          |
| C7206          | <u>CTX-M-15</u> <sup>a</sup>                                     | <i>aac(6')-lb-cr</i>           | FIB, Frep, K                  | 1: <u>120</u> <sup>a</sup>                               | <i>pemkI, ccdAB, vagCD, srnBC</i>          |
| <b>C7207</b>   | <b>CTX-M-15</b> <sup>a</sup> , SHV-2, <u>CMY-2</u> <sup>b*</sup> | <i>aac(3)-II, tet(A), sul3</i> | FIB, Frep, K                  | 3: 55, <b>80</b> <sup>a</sup> , <u>130</u> <sup>b*</sup> | <i>pemkI, hok-sok</i>                      |
| C7203          | <u>CMY-2</u> <sup>b</sup>  | <i>qnrB19, tet(A)</i>          | I1, FIB, K                    | 3: 100, 120, <u>150</u> <sup>b</sup>                     | <i>pndAC</i>                               |
| <b>C7204</b>   | <u>CMY-2</u> <sup>b</sup>  | <i>tet(B), cmlA, sul3</i>      | I1, FIB, Frep, <b>K</b>       | 3: 50, <b>105</b> , <u>145</u> <sup>b</sup>              | <i>pemkI, hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i> |
| <b>C7209</b>   | <u>CMY-2</u> <sup>b</sup>  | -                              | <b>I1</b>                     | 3: 80, <b>150</b> <sup>b</sup> , 285                     | <i>ccdAB, pndAC</i>                        |
| <b>C7201</b>   | <u>CMY-2</u> <sup>b</sup>  | <i>tet(A), cmlA</i>            | FIB, A/C, Frep, <b>K, B/O</b> | 6: 5, 40, 50, <b>100</b> , <u>135</u> <sup>b</sup> , 210 | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC, relBE</i>   |
| C7208          | <u>CMY-2</u> <sup>b</sup>  | <i>tet(A), sul3</i>            | I1, FIB, Frep, K              | 4: 100, 110, <u>135</u> <sup>b</sup> , 240               | <i>pemkI, ccdAB, hok-sok, srnBC, pndAC</i> |
| <b>C7200</b>   | CMY-2  | <i>tet(A), tet(B)</i>          | <b>I1, N</b> , Frep, K        | 2: 105, <b>125</b>                                       | <i>ccdAB, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |

Las cepas conjugativas,  $\beta$ -lactamasas, genes de resistencia y determinantes plasmídicos transferidos por conjugación a las cepas receptoras *E. coli* C600<sup>Rif-R</sup> o *E. coli* J53<sup>Rif-R</sup> están indicadas en negritas.

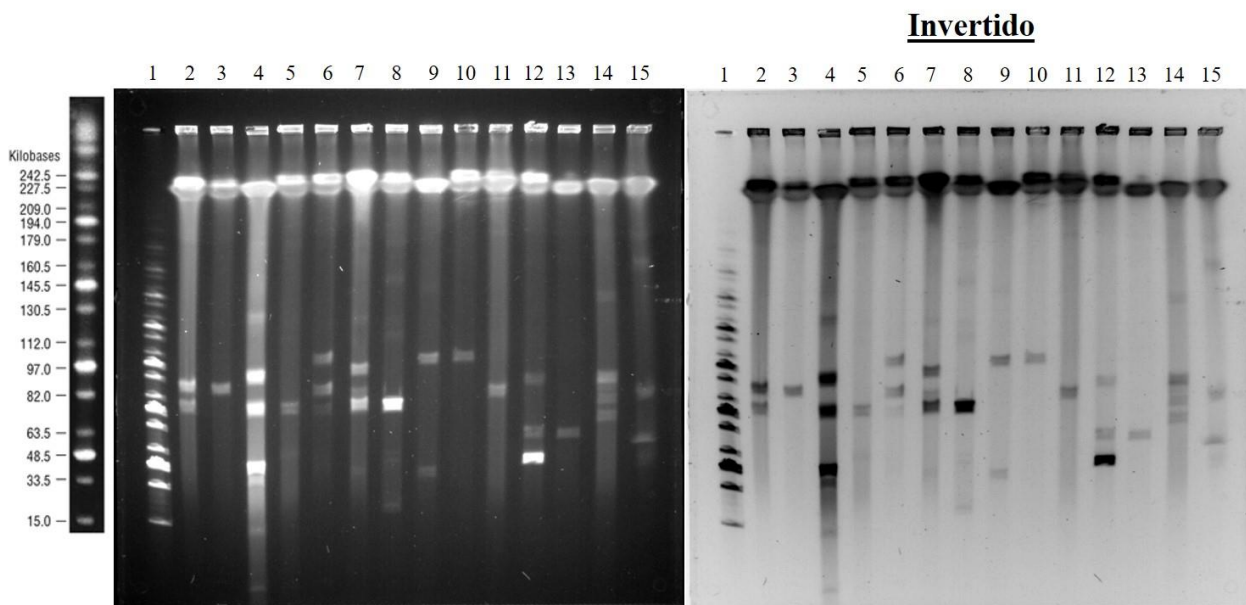
Las  $\beta$ -lactamasas y plásmidos asociados detectados por hibridación están subrayados.

<sup>a</sup>Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el tamaño del plásmido donde fue localizado por hibridación.

<sup>b</sup>Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> y el tamaño del plásmido donde fue localizado por hibridación.

<sup>b\*</sup>Por hibridación, el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> se detectó en el plásmido de 130 kb sólo en la transconjugante de la cepa C7207. En las demás cepas conjugativas portadoras de este gen, éste fue detectado tanto en la cepa donadora como en su transconjugante.

La digestión enzimática con la nucleasa S1 y el subsecuente corrimiento electroforético utilizando la técnica PFGE, mostró la presencia de plásmidos linealizados de diferente tamaño en todas las cepas, así como en los transconjugantes (Figura 5).

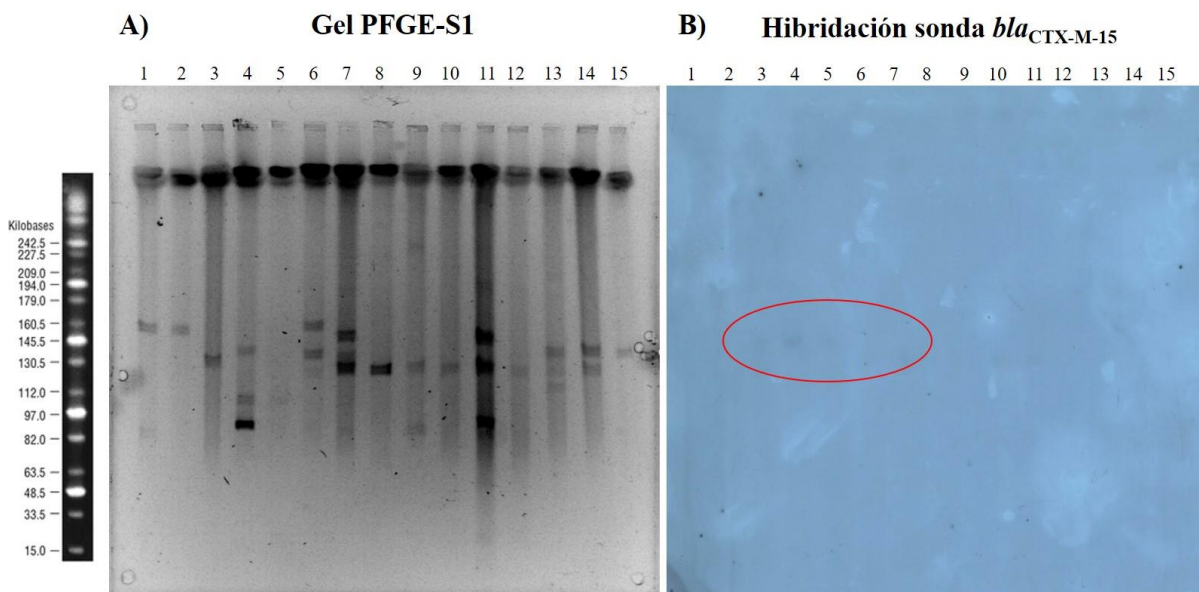


**Figura 5.** PFGE-S1 de las cepas y transconjugantes aisladas de perros. 1, marcador MidRange I PFG Marker (New England Biolabs); 2, C7200; 3, TcC7200/C600; 4, C7201; 5, TcC7201/J53<sup>RIF</sup>; 6, C7203; 7, C7204; 8, TcC7204/C600; 9, C7205; 10, TcC7205/J53<sup>RIF</sup>; 11, C7206; 12, C7207; 13, TcC7207/C600; 14, C7208; 15, C7209.

Todos los aislados mostraron la presencia de replicones plasmídicos de diferentes tamaños (rango de 5 a 150 kb), siendo IncFIB, IncFrep e IncK los más prevalentes, así como diferentes sistemas de adicción (Tabla 19). Los tamaños de los plásmidos fueron aproximados mediante un modelo de regresión lineal creado con el software Statgraphics (Centurion XVI), que calculó el tamaño del plásmido (TP), en función de la distancia experimental de migración (DM) del marcador de peso molecular (MidRange PFG Marker) en el gel PFGE-S1 (Tabla 19). El modelo resultante fue  $TP = (610.502 - 266.25 * DM)$  con  $r^2 = 99.9218$ , con un intervalo de confianza del 95% (error absoluto = 0.05). Ver anexo 4.

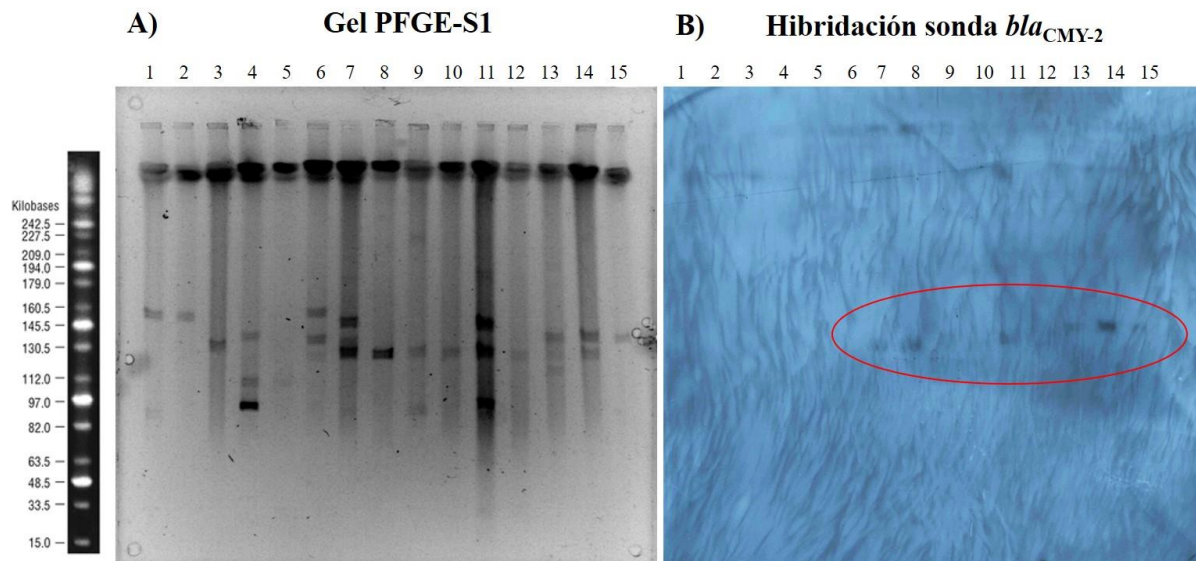
Posterior a esto, se detectaron por hibridación los genes de resistencia *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> y el tamaño de los plásmidos en que se localizaban, tanto en las cepas conjugativas y sus transconjugantes, como en las no conjugativas. El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se detectó en un plásmido de 80 kb y en otro de 150 kb en 2 de las cepas conjugativas, C7207 y C7205, respectivamente, así como en sus transconjugantes (Tabla 19, Figura 6). Adicionalmente, este gen se detectó en otro

plásmido de 120 kb en la cepa no conjugativa C7206. Por otro lado, el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> se detectó en plásmidos de 130, 135, 145 y 150 kb en 5 de las cepas en las que se había identificado por PCR (Tabla 19, Figura 7); sin embargo, no se detectó en la cepa C7200 ni en su transconjugante, en la que ya se había determinado previamente por PCR. En cambio se detectó en la transconjugante de la cepa C7207 (en la que había sido negativa por PCR), por lo que se volvió a realizar la PCR para el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> tanto en la cepa donadora como en la transconjugante, dando negativa nuevamente. Ante esto, se utilizó otro par de oligonucleótidos (*cit*) que abarcan una región interna del gen, a comparación de los oligonucleótidos *bla*<sub>CMY-2</sub>, que fueron diseñados abarcando una región río arriba y una río abajo del gen, por lo que amplifican la secuencia completa del gen *bla*<sub>CMY-2</sub>, detectando así incluso a la secuencia de inserción *ISEcpI* que se encuentra en el entorno genético de *bla*<sub>CMY-2</sub>. La PCR con *cit* fue positiva, por lo que se corroboró la presencia de la  $\beta$ -lactamasa CMY-2 en la cepa C7207, aunque por hibridación el gen codificante para esta enzima sólo se detectó en la transconjugante. Cabe mencionar que no se detectaron genes de virulencia clásicos de *E. coli* diarrogénicas intestinales en estos aislados.



**Figura 6.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de perros y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup>P.

| Carril                           | Tamaño del plásmido localizado |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1: C7200                         | -                              |
| 2: TcC7200/C600                  | -                              |
| 3: C7205                         | 150 kb                         |
| 4: TcC7205/J53RIF <sup>R</sup>   | 150 kb                         |
| 5: C7206                         | 120 kb                         |
| 6: C7207                         | 80 kb                          |
| 7: TcC7207/C600                  | 80 kb                          |
| 8: C7208                         | -                              |
| 9: C7203                         | -                              |
| 10: C7201                        | -                              |
| 11: TcC7201/J53 RIF <sup>R</sup> | -                              |
| 12: C7204                        | -                              |
| 13: TcC7204/C600                 | -                              |
| 14: C7209                        | -                              |
| 15: TcC7209/J53 RIF <sup>R</sup> | -                              |



**Figura 7.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de perros y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CMY-2</sub> marcada con <sup>32</sup>P.

| Carril                           | Tamaño del plásmido localizado |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1: C7200                         | -                              |
| 2: TcC7200/C600                  | -                              |
| 3: C7205                         | -                              |
| 4: TcC7205/J53 RIF <sup>R</sup>  | -                              |
| 5: C7206                         | -                              |
| 6: C7207                         | -                              |
| 7: TcC7207/C600                  | 130                            |
| 8: C7208                         | 135                            |
| 9: C7203                         | 150                            |
| 10: C7201                        | 135                            |
| 11: TcC7201/J53 RIF <sup>R</sup> | 135                            |
| 12: C7204                        | 145                            |
| 13: TcC7204/C600                 | 145                            |
| 14: C7209                        | 150                            |
| 15: TcC7209/J53 RIF <sup>R</sup> | 150                            |

## Discusión

En este trabajo se identificaron cepas de *E. coli* productoras de BLEE y pAmpC aisladas de perros sanos por primera vez en México y en Latino América. El primer aislado de *E. coli* productor de BLEE, del que se tiene reporte, fue recuperado de un perro enfermo en Japón (Matsumoto *et al.*, 1988), seguido de perros con infecciones urinarias en España (Teshager *et al.*, 2000). Subsecuentemente, la prevalencia de *E. coli* BLEE positivas que han sido recuperadas de perros enfermos, se ha reportado en muchas partes del mundo, particularmente en países como Portugal (2%), Estados Unidos (3-7%), Suiza (7%), Australia (11%), Japón (11%) y China (40%) (Costa *et al.*, 2004; O'Keefe *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Platell *et al.*, 2011; Shaheen *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2013). Un estudio hecho en Latino América, reportó a *E. coli* BLEE positivas en perros enfermos en Chile (Moreno *et al.*, 2008). Mientras que los aislados productores de CMY-2, en América, han sido reportados en Estados Unidos y Canadá, tanto en perros sanos como enfermos (Sanchez *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2009; O'Keefe *et al.*, 2010; Shaheen *et al.*, 2011; Bortolaia *et al.*, 2014).

En el presente estudio, 3 de los 53 perros sanos (5.7%) albergaron *E. coli* productores de la BLEE CTX-M-15. Porcentajes similares han sido encontrados en perros sanos de Portugal e Italia (Costa *et al.*, 2004; Carattoli *et al.*, 2005b). En Túnez, un estudio con perros y gatos sanos mostró que el 16% de las cepas produjeron BLEEs y sólo el 1% presentó la enzima CMY-2 (Sallem *et al.*, 2013). Mientras que en Japón, la cefamicinasa CMY-2 se ha reportado hasta en un 39% de los aislados de perros sanos estudiados (Okubo *et al.*, 2014).

Cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 son frecuentemente detectadas en humanos y al parecer, es la  $\beta$ -lactamasa emergente en cepas aisladas de animales, incluyendo perros y gatos enfermos (Pomba *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2010; O'Keefe *et al.*, 2010; Platell *et al.*, 2011; Shaheen *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2014). Esta  $\beta$ -lactamasa también ha sido esporádicamente reportada en perros sanos (Albrechtova *et al.*, 2014; Belas *et al.*, 2014). En este estudio, el gen que codifica para esta BLEE fue detectado en cepas de los filogrupos A y de los ST617, ST410 y ST3944. *E. coli* ST617 productoras de CTX-M-15 han sido reportadas en mascotas enfermas en Francia (Dahmen *et al.*, 2013) y en humanos hospitalizados en Túnez (Ben Sallem *et al.*, 2015). Los linajes ST410 y ST10 (Cplx10) han sido detectados en perros enfermos en Suiza y La Gran Bretaña (Huber *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2014). Hasta nuestro conocimiento, no hay reportes sobre la presencia de la enzima CTX-M-15

en cepas de *E. coli* del linaje ST3944, siendo éste el primer reporte. La detección de la mutación puntual -32 (que sobre expresa la producción del gen *ampC*) en la región reguladora del gen *ampC* y la simultánea presencia de CMY-2 en la cepa ST93 podrían explicar la resistencia a cefoxitina y amoxicilina-ácido clavulánico en este aislado; mientras que en los aislados C7203 y C7209, sólo se detectó la presencia de la cefamicinasa CMY-2, y aunque estuvo acompañada de otras mutaciones en *ampC* (-28, -18, -1 ó +58), estas no son reconocidas como responsables de la sobre expresión de esta proteína, lo que disminuiría la susceptibilidad de estas cepas al  $\beta$ -lactámico cefoxitina, por lo que debería evaluarse el efecto de tales cambios de manera más profunda, iniciando con la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Por otro lado, la resistencia conferida por las BLEE es frecuentemente asociada con la baja susceptibilidad hacia otras clases de antimicrobianos, tales como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol (Coque *et al.*, 2008; Wedley *et al.*, 2011), lo cual puede ser explicado en parte porque algunos plásmidos que albergan por ejemplo a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> o integrones de clase 1, también acarrean genes de resistencia hacia otros antibióticos como las quinolonas, aminoglucósidos o sulfas (Wieler *et al.*, 2011; Ben Sallem *et al.*, 2014). En este trabajo, se identificó una alta frecuencia de aislados BLEE/pAmpC positivos que albergaron integrones de clase 1 o 2 (55%), los cuales tienen insertados casetes génicos que dan resistencia a trimetoprim (*dfrA12*, *dfrA17*) o estreptomicina (*aadA1*, *aadA5* y *aadB*); lo que implica que la adquisición de genes de resistencia hacia diferentes familias de antibióticos a través de estos elementos genéticos movilizables, es un fenómeno recurrente en *E. coli*. Cabe mencionar que la estructura genética *aadB-aadA1* detectado en la cepa C7208, es poco frecuente (<5%) en aislados de *E. coli* (Kang *et al.*, 2005; Karczmarczyk *et al.*, 2011).

Al evaluar la transferencia de determinantes de resistencia, la mayoría de las cepas (6/9) fueron conjugativas bajo las condiciones ensayadas, siendo las  $\beta$ -lactamasas CTXM-15 y CMY-2 las más eficientemente transferidas, acarreadas por plásmidos relativamente grandes (80-150 kb). El gen que codifica para CTX-M-15 se detectó en las 3 cepas BLEE positivas mediante PCR e hibridación. Sin embargo, el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> no se localizó por hibridación en la cepa C7200 ni en su transconjugante, hecho que pudo deberse a la pérdida de plásmido que la acarrea en la cepa donadora; y aunque sí se observan 2 plásmidos con la metodología PFGE-S1, parece que ninguno de ellos alberga el gen codificante para la cefamicinasa CMY-2. Por otro lado, este mismo gen se detectó por hibridación en un plásmido de 130 kb en la transconjugante de la cepa

C7207, pero no en la cepa donadora. El gen no había sido previamente identificado por PCR, por lo que se volvió a realizar la PCR resultando negativa nuevamente. Ante esto, se amplificó una región interna del gen, que resultó positiva, por lo que se corroboró la presencia de la  $\beta$ -lactamasa CMY-2 en la cepa conjugativa C7207 y su transconjugante. Este hecho puede sugerir la presencia de alguna modificación (inserción, delección) en la región adyacente a este gen, por lo que los oligonucleótidos que amplifican a todo el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> no funcionaron, dejando de lado la posibilidad de encontrar al elemento *ISEcpI* en su posición clásica, tomando en cuenta que esta secuencia de inserción se ha relacionado con la alta eficiencia de transferencia del gen *bla*<sub>CMY-2</sub>; mientras que una baja sensibilidad en el experimento de hibridación o la poca cantidad de ADN plasmídico, pudo afectar la detección de este gen en la cepa C7207, no así en su transconjugante. Curiosamente, en las demás cepas CMY-2 positivas, el gen que codifica para esta enzima se detectó por hibridación en plásmidos de tamaños cercanos (130, 135, 145 o 150 kb), y aunado a que la mayoría de las cepas tuvieron en común la presencia del replicón IncFIB (excepto la C7209) y diferentes sistemas de adicción (*pemKI*, *hok-sok*, *pndAC*, *vagCD*, *srnBC* ó *ccdAB*) plasmídicos, mismos que intervienen en la preservación del plásmido en la bacteria, dio lugar a pensar en un principio que podría haber una diseminación plasmídica en estas cepas aisladas de perros provenientes de la misma región geográfica; sin embargo, este hecho quedó descartado debido a que la hibridación específica para esta sonda (IncFIB), resultó negativa en estos plásmidos, por lo que la localización del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en otros replicones no evaluados, es una perspectiva al presente trabajo, así como mapear el entorno genético de la CMY-2 en la cepa C7207.

Por otro lado, cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M han sido identificadas en perros y sus dueños, sugiriendo una transferencia cruzada de *E. coli* (de origen fecal) entre diferentes hospederos (Albrechtova *et al.*, 2012), como se ha evidenciado con otras bacterias como *Staphylococcus aureus* (Gómez-Sanz *et al.*, 2013), por lo que se sugiere que en un estudio posterior, se deberían evaluar los factores de riesgo involucrados en la transmisión bidireccional de *E. coli* multidrogo resistentes entre estos hospederos.

Parte de esta caracterización ha sido publicada en la revista *The Veterinary Journal*, bajo el reporte titulado:

**“Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2  $\beta$ -lactamases”**. Anexo 5.



## 2. TORTUGAS

### Resultados

*E. coli* CTX<sup>R</sup> fueron detectadas en 11 de las 71 tortugas estudiadas (una por muestra, 15.5%), 10 de las cuales habían sido mascotas antes de ser resguardadas en el herpetario y una recolectada del ambiente. Las 11 *E. coli* CTX<sup>R</sup> fueron completamente caracterizadas.

Cuatro de las 11 cepas mostraron producción fenotípica de BLEE, las cuales fueron recuperadas de 2 tortugas hembras y 2 machos de dos especies diferentes (Tabla 20). El gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub> fue detectado en 2 de ellas, y el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en los otros 2 aislados. Las cepas fueron distribuidas en 9 pulsotipos mediante el patrón de restricción PFGE-*Xba*I y el posterior análisis UPGMA (coeficiente de Dice >85%) (Figura 8). Dos grupos de aislados productores de CMY-2 (PT8 y PT9) mostraron el mismo coeficiente de Dice (100%), así como la misma secuencia tipo, ST2329 y ST155, respectivamente; por lo que se concluyó es la misma clona (Figura 8).

Ocho de las 11 *E. coli* CTX-R presentaron resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y/o cefoxitina; 7 de ellos fueron BLEE negativos. El gen que codifica para la β-lactamasa CMY-2 fue detectado en estas 8 *E. coli* (uno de ellos también albergó el gen *bla*<sub>CTX-M-2</sub>), con fenotipo BLEE positivo (Tabla 20). El gen *bla*<sub>CMY-2</sub> estuvo flanqueado por la secuencia de inserción (IS) *ISEcp1* y el transposón (tn) *tnpA* en la región río arriba; y por el gen *btc* en la región río abajo. Los aislados CMY-2 positivos presentaron alta diversidad genética con 6 diferentes pulsotipos (Figura 10); estos aislados fueron adscritos a los filogrupos (número de aislados): B1 (n= 6), A (n=1) y D (n=1); así como a las ST155, ST156, ST2329 y ST2732. También se detectaron mutaciones puntuales en la región reguladora del gen *ampC* en 6 *E. coli* CMY-2 positivas (-18, -1, +58 en todos los aislados, así como en +54 en dos de ellos) (Tabla 21). La tabla 21 muestra los genes de resistencia a otros antimicrobianos en las 11 *E. coli* estudiadas. Cinco de ellas albergaron genes RQMP [*qnrA*, *qnrB19*, *aac(6')-lb-cr* y *oqxB*]. La cepa C7222 albergó 3 genes: *aac(6')-lb-cr*, *qnrB* y *oqxB*. Los genes que dan resistencia a tetraciclina *tet(A)* y/o *tet(B)* se detectaron en 10 de las 11 cepas estudiadas. Diferentes cambios aminoacídicos fueron identificados en la subunidades GyrA (posiciones 83 y 87) y ParC (posiciones 80 y 84) de las cinco *E. coli* resistentes a la fluoroquinolona ciprofloxacino (Tabla 21).

**Tabla 20.** Tipado molecular,  $\beta$ -lactamasas identificadas, tipado de plásmidos y localización de determinantes de resistencia de las *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de tortugas.

| <i>E. coli</i> | Tortugas<br>(sexo/origen) <sup>a</sup> | Pulsotipo<br>PFGE | MLST            |                | BLEE/pAmpC<br>detectadas            | Caracterización plasmídica              |                                     |  |
|----------------|--|-------------------|-----------------|----------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--|
|                |  |                   | ST              | ST-Cplx        |                                     | Replicón                                | Número: tamaño<br>(kb)              | Sistemas de adicción                       |
| C7210          | <i>K. integrum</i> (M/M)               | PT1               | 2732            | - <sup>c</sup> | CTX-M-2                             | I1, FIB, FIC, Frep                      | 3: 45, 85, 170                      | <i>hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i>        |
| C7212          | <i>K. integrum</i> (F/M)               | PT2               | 2732            | -              | CTX-M-2/ CMY-2                      | I1, FIB, FIC, Frep                      | 4: 85, 120, 165, 220                | <i>hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i>        |
| <b>C7221</b>   | <i>T. scripta elegans</i> (F/M)        | PT4               | 58              | 155            | <b>CTX-M-15<sup>d</sup></b>         | <b>FIB<sup>d</sup></b> , Y, Frep, K     | 3: <b>65, 120<sup>d</sup></b> , 145 | <b><i>pemKI, ccdAB, hok-sok, srnBC</i></b> |
| C7215          | <i>K. integrum</i> (M/M)               | PT7               | 156             | 156            | <u>CTX-M-15<sup>d</sup></u> , TEM-1 | I1, FIB, Frep, K                        | 2: 100, <u>135<sup>d</sup></u>      | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
| <b>C7222</b>   | <i>K. integrum</i> (F/M)               | PT3               | 156             | 156            | <b>CMY-2<sup>e</sup></b>            | <b>I1<sup>e</sup></b> , FIB, Frep, K    | 3: <b>85<sup>e</sup></b> , 145, 190 | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC</i>          |
| C7211          | <i>K. integrum</i> (F/M)               | PT8               | 2329            | -              | CMY-2                               | I1, N, FIB, Frep, K                     | 2: 90, 130                          | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
| <b>C7214</b>   | <i>K. integrum</i> (F/M)               | PT8               | 2329            | -              | <b>CMY-2<sup>e</sup></b>            | I1, N, <b>FIB<sup>e</sup></b> , Frep, K | 2: <b>90<sup>e</sup>, 130</b>       | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
| C7218          | <i>T. scripta elegans</i> (F/M)        | PT9               | 155             | 155            | <u>CMY-2<sup>e</sup></u>            | FIB, P, Frep, K, B/O                    | 2: 100, <u>125<sup>e</sup></u>      | <i>vagCD, srnBC</i>                        |
| C7220          | <i>T. scripta elegans</i> (M/M)        | PT9               | 155             | 155            | <u>CMY-2<sup>e</sup></u>            | FIB, P, Frep, K, B/O                    | 2: 100, <u>125<sup>e</sup></u>      | <i>vagCD, srnBC</i>                        |
| <b>C7219</b>   | <i>C. serpentine</i> (M/A)             | PT6               | ND <sup>b</sup> | ND             | <b>CMY-2<sup>e</sup></b>            | <b>FIB<sup>e</sup></b> , Frep, K        | 3: 70, <b>90<sup>e</sup>, 195</b>   | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC</i>          |
| C7216          | <i>K. integrum</i> (M/M)               | PT5               | ND              | ND             | <u>CMY-2<sup>e</sup></u>            | FIB, <u>I1</u> , Frep, K                | 2: 70, <u>95<sup>e</sup></u>        | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |

<sup>a</sup>Sexo: F, femenino; M, masculino; Origen previo al resguardo en el herpetario: M, mascota; A, ambiental.

<sup>b</sup>ND: no determinado.

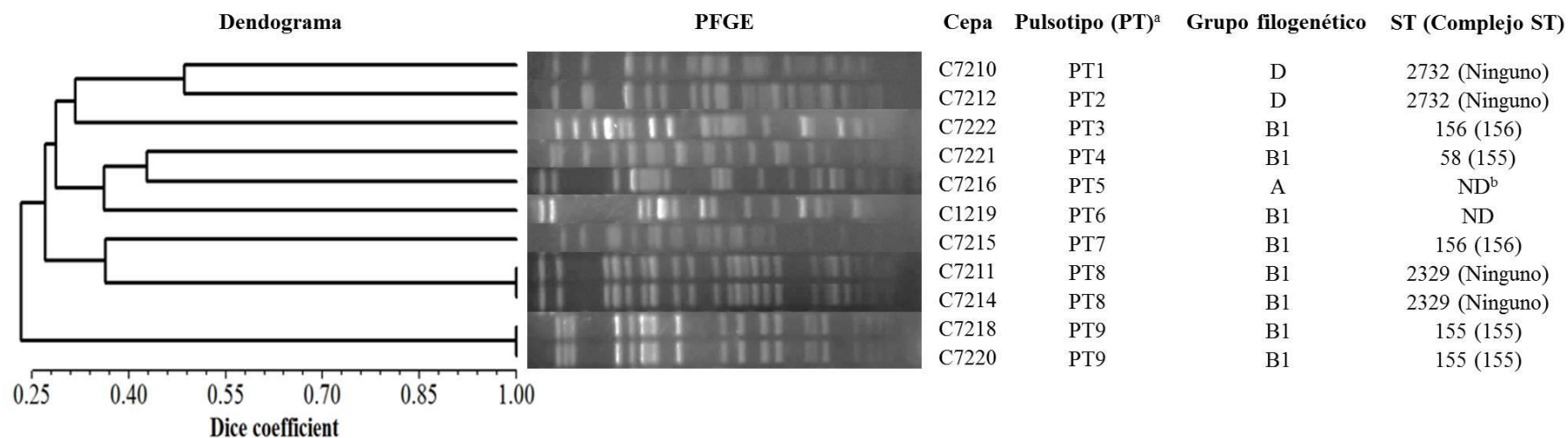
<sup>c</sup> -: Complejo ST no asignado.

Cepas conjugativas,  $\beta$ -lactamasas y plásmidos transferidos por conjugación están indicadas en negritas.

$\beta$ -lactamasas y plásmidos asociados que se detectaron por hibridación están subrayados.

<sup>d</sup>Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el tipo de plásmido donde fue localizado por hibridación.

<sup>e</sup>Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> y el tipo de plásmido donde fue localizado por hibridación.



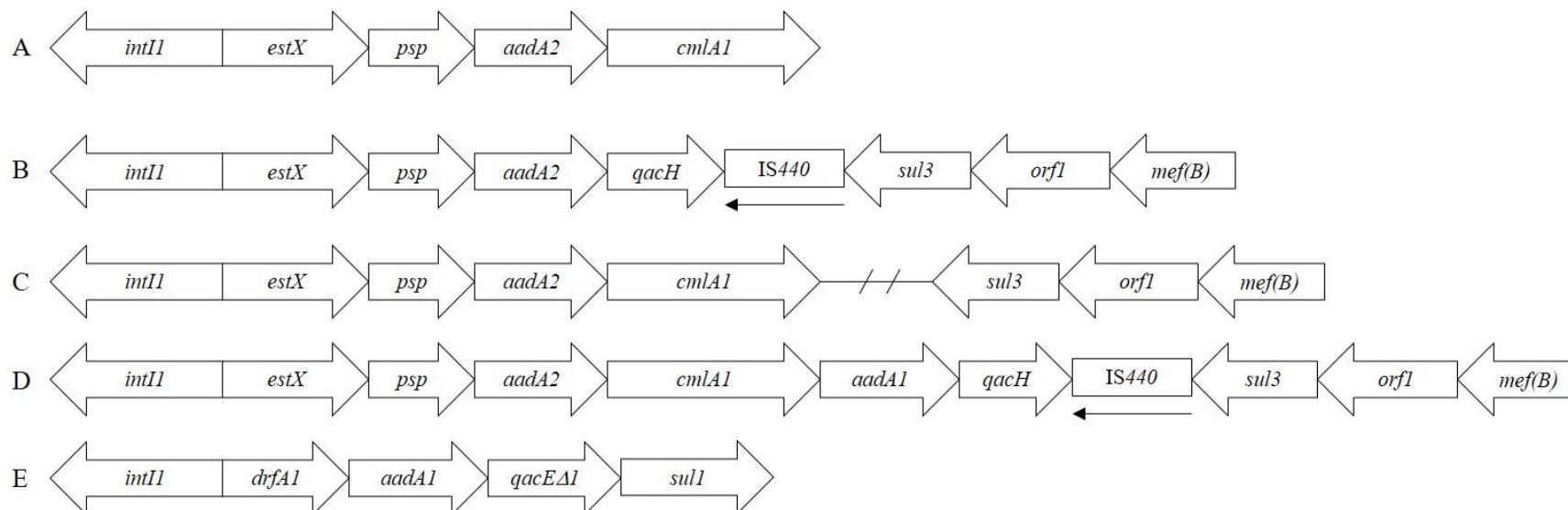
**Figura 8.** Dendrograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica-*XbaI* y tipado molecular de las 11 *E. coli* productoras de BLEE y CMY-2 aisladas de tortugas.

<sup>a</sup>: Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice (valor > 85%).

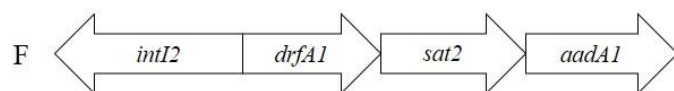
<sup>b</sup>: No determinado.

El gen que codifica para la integrasa de clase 1 (*intI1*) se detectó en 9 de las 11 *E. coli* CTX<sup>R</sup>, y se describieron 5 estructuras genéticas en la región variable del integrón (Figura 9). Cuatro de estas estructuras fueron localizados en integrones no clásicos (carecieron de la región conservada 3'), la mayoría de ellos asociados al gen *sul3*; mientras que la quinta estructura genética (*dfrA1-aadA1*) se identificó en un integrón clásico. Cuatro aislados fueron positivos por PCR al gen *intI2* y la estructura *dfrA1-sat2-aadA1* fue localizada en 2 de ellos (Figura 11, Tabla 21).

## Integrones clase 1



## Integrones clase 2



**Figura 9.** Estructura de los casetes génicos detectados en los integrones de clase 1 y clase 2 en las *E. coli* aisladas de tortugas.

**Tabla 21.** Características de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE o pAmpC en relación a integrones y otros mecanismos de resistencia.

| <i>E. coli</i> strain | Resistencia a agentes no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup> | Genes de resistencia a agentes no $\beta$ -lactámicos <sup>b</sup> | Integrones clase 1                           |                                  | Integrones clase 2 |                                  | Mutaciones en el gen cromosomal <i>ampC</i> | Cambio de aminoácidos |            |
|-----------------------|---|--|--|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|---|-----------------------|------------|
|                       |   |  | <i>intI1/qacE<math>\Delta</math>1 + sulI</i> | Estructura genética <sup>c</sup> | <i>intI2</i>       | Estructura genética <sup>c</sup> |   | GyrA                  | ParC       |
| C7210                 | NA, CI, G, S, C, TM, SXT, TE                              | <i>qnrA, aac(3)-II, tet(A), sul3</i>                               | +/+  | A                                | +                  | F                                | ND <sup>e</sup>                             | S83L, D87N            | S80I       |
| C7212                 | NA, CI, G, T, S, C, TM, SXT, TE                           | <i>aac(3)-II, sul3</i>   | +/+  | A                                | +                  | F                                | Wild  | S83L, D87N            | S80I       |
| C7221                 | C, TM, SXT, TE  | <b><i>tet(A), sul3</i></b>   | +/-  | ni <sup>d</sup>                  | -                  | -                                | ND  | ND                    | ND         |
| C7215                 | NA, CI, G, T, S, C, TM, SXT, TE                           | <i>aac(3)-II, tet(B), cmlA</i>                                     | +/-  | B                                | -                  | -                                | ND  | S83L, D87N            | S80I, E84A |
| C7222                 | NA, CI, S, C, TMP, SXT, TE                                | <i>qnrB19, OqxB, aac(6')Ib-cr, tet(A)</i>                          | +/+  | C                                | -                  | -                                | -18, -1, +58                                | S83L, D87H            | S80I       |
| C7211                 | NA, S, TE   | <i>qnrB19, tet(A)</i>  | +/-  | ni <sup>d</sup>                  | -                  | -                                | -18, -1, +54, +58                           | ND                    | ND         |
| C7214                 | S, TM, SXT, TE  | <i>qnrB19, tet(A)</i>  | +/-  | ni <sup>d</sup>                  | -                  | -                                | -18, -1, +54, +58                           | ND                    | ND         |
| C7218                 | S, C, TM, SXT, TE   | <i>tet(A)</i>  | -/-  | -                                | +                  | ni <sup>d</sup>                  | -18, -1, +58                                | ND                    | ND         |
| C7220                 | S, C, TM, SXT, TE   | <i>tet(A)</i>  | -/-  | -                                | +                  | ni <sup>d</sup>                  | -18, -1, +58                                | ND                    | ND         |
| C7219                 | NA, CI, G, S, TM, SXT, TE                                 | <b><i>qnrA, aac(3)-II, tet(A), tet(B),</i></b>                     | +/-  | D                                | -                  | -                                | ND  | S83L, D87N            | S80I       |
| C7216                 | C, TM, SXT, TE  | <i>tet(A)</i>  | +/+  | E                                | -                  | -                                | -18, -1, +58                                | ND                    | ND         |

<sup>a</sup>NA: ácido nalidíxico; CI: ciprofloxacino; G: gentamicino; T: tobramicina; S: streptomycin; C: cloranfenicol; TM: trimetoprim; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; TE: tetraciclina.

Los puntos de corte para los agentes antimicrobianos se interpretaron de acuerdo al CLSI, 201

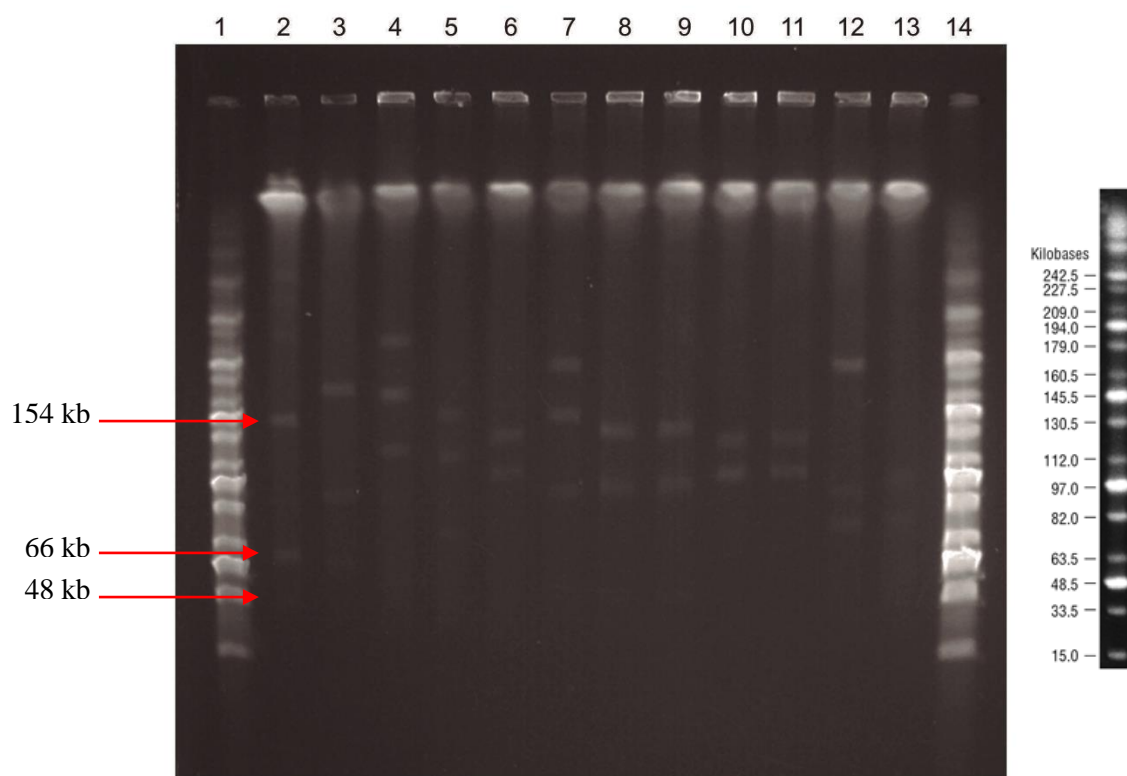
<sup>b</sup>Determinantes de resistencia transferidos por conjugación las cepas receptoras *E. coli* C600 o J53 están indicadas en negritas.

<sup>c</sup>Estas estructuras corresponden a aquellas representadas en la Figura 10.

<sup>d</sup>ni: arreglo no identificado con las amplificaciones realizadas. <sup>e</sup>ND: no determinado.

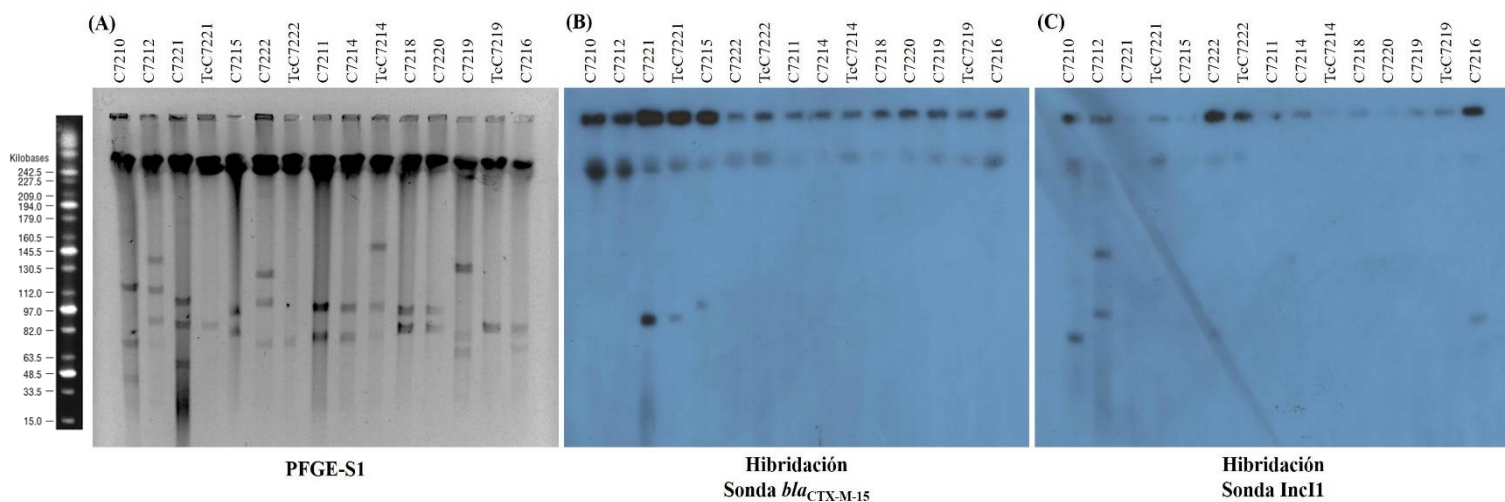
Al menos tres diferentes replicones plasmídicos fueron identificados por PCR en las 11 *E. coli* estudiadas, siendo IncFrep, IncFIB, IncK e Inc11 los más prevalentes; así como diferentes sistemas de adicción (Tabla 20). La digestión genómica por PFGE-S1 reveló que los aislados albergaron de 2 a 4 plásmidos de 45 a 220 kb (Figura 10).

Los tamaños de los plásmidos fueron aproximados mediante un modelo de regresión lineal creado con el software Statgraphics (Centurion XVI), que calculó el tamaño del plásmido (TP), en función de la distancia experimental de migración (DM) del marcador de peso molecular (MidRange PFG Marker) en el gel PFGE-S1. El modelo resultante fue  $TP = (23.1383 - 0.245662 * DM)$  con  $r^2 = 99.9649$ , con un intervalo de confianza del 95% (error absoluto = 0.05). Ver anexo 4.



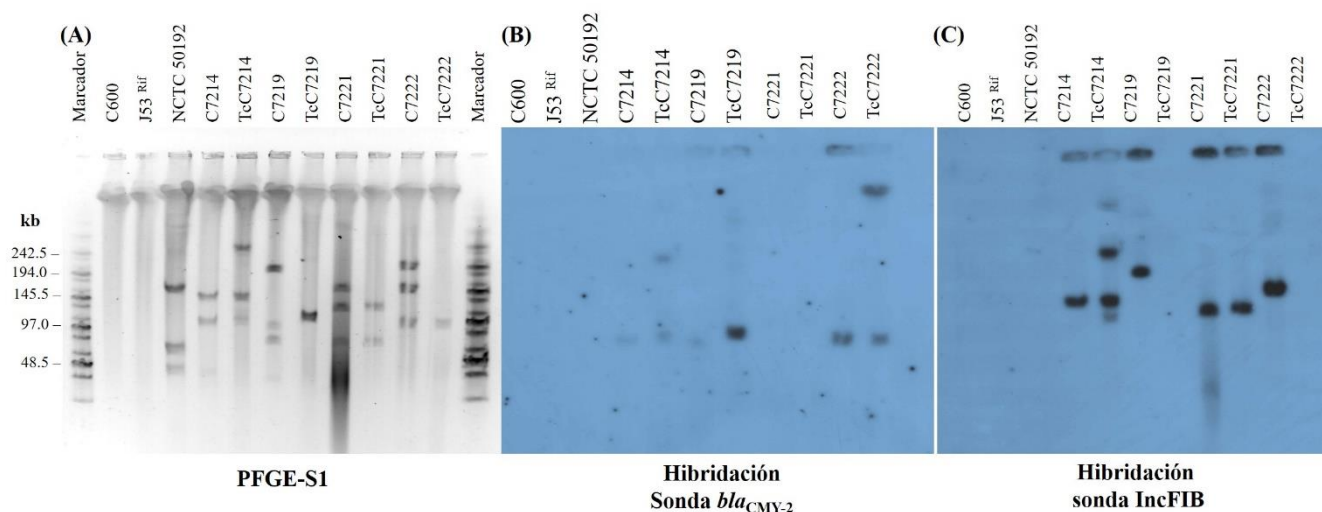
**Figura 10.** Gel PFGE-S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos en las 11 cepas de *E. coli* aisladas de tortugas. 1 y 14, MidRange I PFG Marker (New England Biolabs®); 2, Cepa de referencia NCTC 50192 (mostrando plásmidos de 154, 66 y 48kb); 3, C7210, 4, C7212; 5, C7221; 6, C7215; 7, C7222; 8, C7211; 9, C7214; 10, C7218; 11, C7220; 12, C7219; 13, C7216.

Se llevaron a cabo experimentos de conjugación en todos los aislados, de las cuales sólo en 4 se logró obtener transconjugantes: C7214, C7219, C7221 y C7222; en las que se transfirieron los genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>, *tet*(A), *sul3* y *qnrA*; así como los replicones plasmídicos IncFIB e IncII de diferente tamaño (Tabla 20). El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue localizado por hibridación en un plásmido de 120 kb en la cepa conjugativa C7221, así como en su transconjugante (Figura 13). Este mismo gen fue detectado en un plásmido de 135 kb en la cepa no conjugativa C7215 (Figura 11).



**Figura 11.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de tortugas y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup>P. C) Autorradiografía de hibridación para el replicón IncII.

Por otro lado, el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> fue detectado en plásmidos IncII de 85kb (en la cepa conjugativa C7222) o 95 kb (cepa no conjugativa C7216), así como en un plásmido IncFIB de 90 kb en las cepas conjugativas C7214 y C7219 (Tabla 20; Figuras 11, 12). Adicionalmente, este mismo gen (*bla*<sub>CMY-2</sub>) fue localizado en un plásmido de 125 kb en las cepas C7218 y C7220 (Figura 12), aunque el tipo de replicón no pudo ser localizado; ambas cepas presentaron el mismo pulsotipo (PT9) y el mismo ST (ST155), por lo que se trata de la misma clona, sólo que fueron recuperadas de 2 tortugas (una hembra y un macho) de la misma especie (*T. scripta elegans*) (Tabla 20). Durante los ensayos de conjugación, se evidenció la cotransferencia de los genes *qnrA* y *bla*<sub>CMY-2</sub> en la cepa C7219 (Tablas 20, 21).



**Figura 12.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de tortugas y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CMY-2</sub> marcada con <sup>32</sup>P. C) Autorradiografía de hibridación para el replicón IncFIB.

## Discusión

Es relevante la alta frecuencia de *E. coli* productoras de BLEE y especialmente de pAmpC, entre las tortugas estudiadas (15.5%). Los aislados presentaron diversidad en cuanto a los patrones de PFGE (9 pulsotipos diferentes) y secuencias tipo (5 diferentes ST), por lo que una diseminación clonal parcial no debe ser descartada, debido a que algunos animales albergaron aislados de *E. coli* con patrones PFGE idénticos o al menos relacionados (C7211/C7214, C7218/C7220 y C7210/C7212) (Figura 10), lo cual puede contribuir, en parte, a la alta prevalencia detectada. Sin embargo, la propagación de plásmidos entre las clonas de *E. coli*, es otra posibilidad. El origen de la resistencia de estas *E. coli* BLEE/pAmpC positivas, puede estar relacionado con el alimento usado para las tortugas dentro del herpetario (hígado de pollo, vegetales, tenebrios o croquetas comerciales), ya que se ha reportado una alta prevalencia de *E. coli* productoras de BLEE o pAmpC, aisladas de animales destinados al consumo, particularmente pollos (Ferreira *et al.*, 2014); por lo que el alimentar a las tortugas con hígado de pollo crudo puede ser una causa de colonización por esta bacteria. Sin embargo, no podemos excluir la potencial adquisición de estas bacterias multidrogo resistentes durante su periodo de estancia en el herpetario o previo a su resguardo, tomando en cuenta que la mayoría (67 de 71) habían sido mascotas, por lo que habían tenido contacto con humanos u otros hospederos en el ambiente doméstico.



Las BLEE CTX-M2 y CTX-M-15 corresponden a las variantes más frecuentemente reportadas entre aislados clínicos de *E. coli* en Latino América (García-Fulgueiras *et al.*, 2011; Sennati *et al.*, 2012; Redondo *et al.*, 2013) y México (Rocha-Gracia *et al.*, 2010; Silva-Sánchez *et al.*, 2013), respectivamente. La variante CTX-M-15 fue detectada en aislados de los linajes ST58 y ST156, como se ha reportado previamente en aislados de humanos y animales en los Países Bajos y Chile (Dierikx *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2013); sin embargo, el linaje ST2732 asociado a la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-2 detectado en este estudio, no había sido reportado previamente.

Es de relevancia la alta frecuencia de aislados productores de CMY-2 detectados en este trabajo (8 de 71, 11.3%). CMY-2 es la  $\beta$ -lactamasa tipo pAmpC más diseminada a nivel mundial en aislados clínicos de *E. coli* (Jacoby 2009). Esta variante ha sido detectada en aislados de *Salmonella* provenientes de humanos y perros sanos en México (Wiesner *et al.*, 2013; Zaidi *et al.*, 2013) y Sudamérica (Cejas *et al.*, 2014). Es destacable que *Salmonella* está asociada con la colonización en reptiles (Chen *et al.*, 2010; Whitten *et al.*, 2015) como tortugas (Díaz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013); por esta razón, una posible transferencia del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> entre *Salmonella* y *E. coli* no puede ser descartada, sobre todo por la evidencia de que plásmidos que albergan el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> son comúnmente transferidos entre estas dos bacterias, lo que sugiere una amplia diseminación de la  $\beta$ -lactamasa CMY-2 entre diferentes especies bacterianas y hospederos (Winokur *et al.*, 2001), ocasionando un problema alarmante debido a la creciente popularidad de algunos reptiles como mascotas y al contacto directo que tienen con los humanos. La presencia de *E. coli* productoras de CMY-2 aisladas de tortugas que fungieron como mascotas, representa una ventaja evolutiva para la propagación de determinantes de resistencia hacia  $\beta$ -lactámicos, como consecuencia del uso indiscriminado de este grupo de antimicrobianos tanto en la medicina humana como en la veterinaria.

Es de interés que el grupo filogenético B1, el cual se ha asociado con aislados comensales y ambientales, fue el más frecuentemente identificado entre las *E. coli* productoras de CTX-M-15 o CMY-2. Por otro lado, los aislados productores de CTX-M-2 pertenecieron al grupo filogenético D, que se ha relacionado con cepas patogénicas extra intestinales, con más factores de virulencia que los filogrupos comensales A o B1 (Carlos *et al.*, 2010). Sin embargo, ninguno de los factores de virulencia, clásicos en *E. coli* patogénicas intestinales, fue detectado por PCR en las cepas estudiadas.

El gen *bla*<sub>CMY-2</sub> ha sido asociado con los replicones de amplio rango de hospedero IncI1, IncA/C, IncFII, IncI2, IncL/M e IncB/O en *E. coli* aisladas de humanos, animales de compañía y animales destinados al consumo humano (Bortolaia *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2014). Nuestras cepas albergaron diferentes replicones, como IncFIB, IncI1, IncFrep e IncK; y el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> fue detectado en plásmidos de 85-95 kb en cuatro de ellas. El tamaño de los plásmidos que acarrearon el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> (125kb) fue detectado en dos de las cepas, pero no el tipo de replicón plasmídico, debido a que se puede tratar de un replicón no buscado en nuestro estudio. El gen *bla*<sub>CMY-2</sub> fue cotransferido con el gen *qnrA* en la cepa C7219, pero ninguno de los dos genes fue localizado en el plásmido FIB de 195 kb detectado por hibridación en esta cepa. La caracterización plasmídica sugiere una amplia diversidad de plásmidos conjugativos y no conjugativos que albergan el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa CMY-2 en estas cepas. El posible intercambio de plásmidos que albergan este gen entre aislados de *E. coli* se ha reportado ampliamente en humanos y animales relacionados con la producción de alimentos, pero la diseminación de los determinantes de resistencia en mascotas ha recibido menos atención.

Aunado a esto, en este trabajo se describió una gran variedad de elementos genéticos implicados en la movilización de genes *pAmpC*, como la secuencia de inserción *ISEcp1*, asociada con el gen *bla*<sub>CMY-2</sub>, que es capaz de movilizar y cumplir la función de un eficiente promotor para sobre expresar genes vecinos, como el gen *bla* dentro de plásmidos conjugativos (Jacoby, 2009).

La diseminación global de la BLEE CTX-M-15 está principalmente asociada con los grupos de incompatibilidad plasmídicos del grupo F, aunque otros como IncN, IncI1 e IncL/M, también se han visto involucrados (Cantón *et al.*, 2012); en este trabajo se detectó un plásmido FIB de 120 kb que acarreó el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> simultáneamente en una cepa conjugativa y en su transconjugante. Este gen también fue detectado en un plásmido de 135kb que no hibridó con las sondas IncFIB o IncI1, por lo que no se puede descartar que este plásmido corresponda al replicón IncK (ya que fue el otro replicón detectado por PCR); sin embargo, la hibridación específica con la sonda de este replicón no fue realizada.

Los animales estudiados albergaron cepas resistentes a fluoroquinolonas (7%) asociados a genes RQMP. Pero es la presencia del gen *oqxB* la que llama la atención, ya que es un gen muy inusual que sólo se ha detectado en aislados provenientes de materia fecal de cerdos en Dinamarca (Hansen *et al.*, 2004), o de animales de granja, granjeros y del ambiente en China (Zhao *et al.*, 2010), así como en aislados clínicos de *E. coli* en España (Ruiz *et al.*, 2012). Este gen codifica

para una bomba de eflujo que se encuentra normalmente en el cromosoma de *Klebsiella pneumoniae* y que está asociado con una reducción a la susceptibilidad en fluoroquinolonas; el gen también se encontró junto con otros genes RQMP en la clona ST156 productora de la  $\beta$ -lactamasa CMY-2, lo que podría explicar la resistencia de este linaje hacia las quinolonas y a los  $\beta$ -lactámicos. De igual manera, se detectaron genes de resistencia hacia sulfonamidas, cloranfenicol y trimetoprim insertados en integrones de clase 1 o 2, sugiriendo que estos elementos movilizables están implicados en los fenotipos de multirresistencia evidenciados en estas cepas, como se ha evidenciado (Sáenz *et al.*, 2010).

El estudio realizado con este grupo de cepas, ha sido publicado en la revista *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, con el título:

**“Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* strains producers of extended-spectrum and CMY-2 type beta-lactamases, isolated from turtles in Mexico”.**

Anexo 5.

### 3. PORTADORES HUMANOS

#### Resultados

De un total de 60 voluntarios sanos, en 11 de ellos se recuperaron *E. coli* CTX<sup>R</sup> (1 cepa por persona, 18%) y se sometieron a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Todas las cepas fueron multirresistentes y fenotípicamente productoras de BLEE (Tabla 22), por lo que se buscó la presencia de determinantes genéticos de resistencia. Seis de los 11 aislados albergaron el gen que codifica para la BLEE CTX-M-15, asociada con OXA-1 en 5 de ellos; mientras que dos variantes de CTX-M-14 (CTX-M-14a o CTX-M-14b) así como la  $\beta$ -lactamasa TEM-1b, fueron detectadas en los otros 5 aislados (Tabla 22). También se identificaron genes que brindan resistencia a quinolonas [*aac(6')-Ib-cr*, *qnrB19*], aminogucósidos [*aac(3')-II*] y tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*] en los diferentes aislados. Adicionalmente, se detectaron casetes genéticos insertados integrones de clase 1 (*drfA17-aadA5*) y 2 (*drfA12-sat2-aadA1*) (Tabla 22). Las cepas fueron distribuidas en los grupos filogenéticos (número de aislados): A (2), B2 (4) y D (5); y asignadas a diferentes ST. Cuatro *E. coli* del filogrupo B2 pertenecieron al complejo ST131 (ST131 y ST4225) y todas ellas albergaron el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>; mientras que los filogrupos A y D estuvieron asociados al complejo clonal ST-Cplx648. Se detectaron cuatro ST nuevos: ST5060, ST5079, ST5080 y ST5081, mismos que fueron depositados en la base de datos MLST de *E. coli* de la Universidad de Warwick (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>). También se identificaron 8 pulsotipos mediante los patrones de restricción con PFGE-*XbaI* y se agruparon en un dendograma UPGMA (Figura 13).

Dos cepas portadoras de CTX-M-14a (ST5080) y dos con CTX-M-14b (ST5081), se aislaron de cuatro voluntarios que vivían en la misma casa; estas cepas compartieron los pulsotipos PT4 y PT5, respectivamente (Figura 15). Las 4 *E. coli* ST131 también estuvieron cercanamente relacionadas (PT7a, PT7b y PT7c) y curiosamente, dos de ellas (PT7a y PT7b) se aislaron de dos miembros de una familia (Tabla 22; Figura 13).

Los 4 aislados ST131 fueron subtipificados mediante la serotipificación de los antígenos O y H, así como mediante la secuenciación del gen *fimH*, dando como resultado los antígenos O25:H4 y la variante 30 de *fimH*, respectivamente; lo que llevó a detectar a la subclona ST131-B2-O25:H4-H30-Rx, resistente a fluoroquinolonas y productora de CTX-M-15, en el 36% de las *E. coli* aisladas de voluntarios sanos.

**Tabla 22.** Tipado molecular y perfil de resistencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de portadores humanos.

| Cepa               | Voluntarios              |                    | Grupo filogenético | Pulsotipo PFGE | ST/Complejo ST            | Serotipo/alelo <i>fimH</i> <sup>d</sup> | Perfil de resistencia <sup>e</sup>   | $\beta$ -lactamasas detectadas | Genes de resistencia para no $\beta$ -lactámicos  |
|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------|---------------------------|---|--|--------------------------------|---|
|                    | Género/Edad <sup>b</sup> | Relación           |                    |                |                           |   |  |                                |   |
| C7223              | F/18                     |                    | B2                 | PT6            | 4225/131                  | O25:H4/30                               | AMP, AMC, CTX, CAZ, NA, CIP, S, NN, TE, SXT  | CTX-M-15, OXA-1                | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i>  |
| C7225              | M/21                     | Miembros del hogar | B2                 | PT7a           | 131/131                   | O25:H4/30                               | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, CIP, GM, AK, NN, TE,   | CTX-M-15, OXA-1                | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>  |
| C7226              | F/54                     |                    | B2                 | PT7b           | 131/131                   | O25:H4/30                               | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, CIP, GM, AK, NN, TE  | CTX-M-15, OXA-1                | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3')-II</i>  |
| C7230              | M/52                     |                    | B2                 | PT7c           | 131/131                   | O25:H4/30                               | AMP, CTX, CAZ, FEP, IMP, ATM, NA, CIP, S, GM, NN   | CTX-M-15                       | <i>tet(A)</i>   |
| C7227              | F/36                     |                    | D                  | PT2            | 2873/648                  | ND                                      | AMP, AMC, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, CIP, S, GM, AK, NN  | CTX-M-14a, TEM-1b              | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   |
| C7231              | M/29                     |                    | D                  | PT4            | 5080/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, CIP, S, GM, NN, C  | CTX-M-14a, TEM-1b              | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   |
| C7234              | F/45                     | Miembros del hogar | D                  | PT4            | 5080/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | AMP, AMC, CTX, CAZ, ATM, NA, CIP, S, GM, NN, TE, SXT   | CTX-M-14a, TEM-1b              | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   |
| C7235              | F/52                     |                    | D                  | PT5            | 5081/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, S, TE, SXT, C  | CTX-M-14b, TEM-1b              | -   |
| C7236              | M/25                     |                    | D                  | PT5            | 5081/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, S, TE, SXT, C  | CTX-M-14b, TEM-1b              | -   |
| C7224              | F/45                     |                    | A                  | PT1            | 5079/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | AMP, AMC, CTX, CAZ, FEP, ATM, NA, CIP, S, GM, AK, NN, TE, SXT  | CTX-M-15, OXA-1                | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac(3')-II</i>                          |
| C7239 <sup>a</sup> | F/19                     |                    | A                  | PT3            | 5060/Ninguno <sup>c</sup> | ND                                      | <u>AMP</u> , <u>AMC</u> , <u>CTX</u> , <u>CAZ</u> , FEP, ATM, NA, <u>CIP</u> , S, AK, NN, <u>TE</u> , <u>SXT</u> | <b>CTX-M-15</b> , <u>OXA-1</u> | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB19</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> |

<sup>a</sup> Cepa conjugativa. Los determinantes de resistencia y características transferidas por conjugación a la cepa receptora *E. coli* J53<sup>Rif-R</sup> están subrayados.

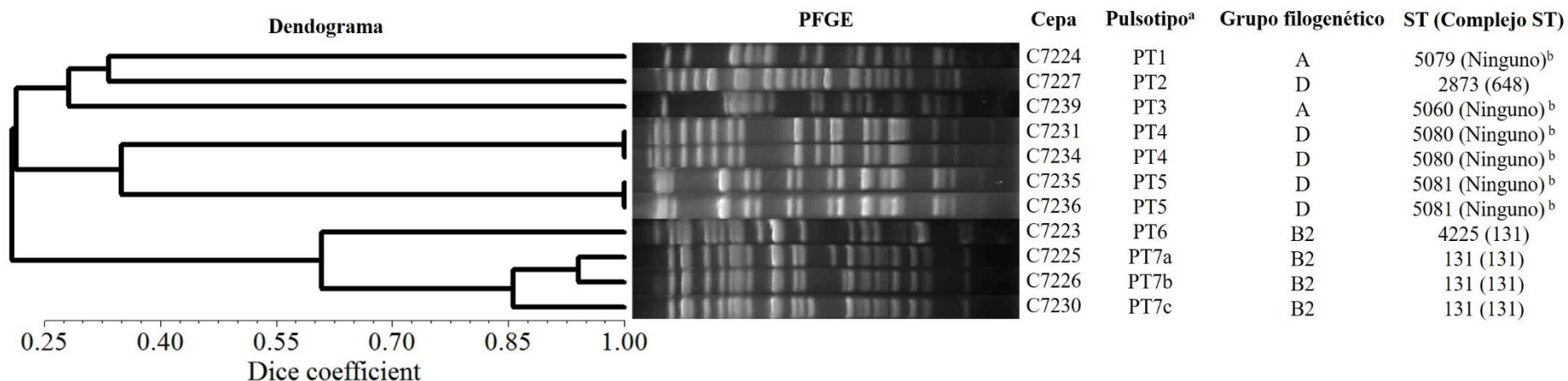
El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> que fue localizado por hibridación en la cepa donadora y en su transconjugante, están en negritas.

<sup>b</sup> F: femenino; M: masculino; la edad está expresada en años.

<sup>c</sup> Estas secuencias tipo son nuevas y fueron depositadas en la base de datos para MLST de *E. coli*: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>

<sup>d</sup> Los antígenos somático y flagelar, así como la variante del alelo *fimH* fueron determinados sólo en los aislados ST131; ND: No determinado.

<sup>e</sup> AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; NA: ácido nalidíxico; CIP: ciprofloxacino; S: estreptomina; GM: gentamicina; AK: amikacina; NN: tobramicina; C: cloranfenicol TE: tetraciclina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol.



**Figura 13.** Dendrograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica-*Xba*I y tipado molecular de las *E. coli* productoras de BLEE recuperadas de humanos sanos.

<sup>a</sup>: Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice (valor  $\geq 85\%$ ).

<sup>b</sup>: Estas secuencias tipo son nuevas y fueron depositadas en la base de datos para MLST de *E. coli*: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>.

La caracterización plasmídica mostró la presencia de los replicones FIA, FIB, Frep y K con diferentes tamaños (Tabla 23; Figura 14); así como la presencia de sistemas de adicción plasmídicos, siendo *pemKI*, *srnBC*, *ccdAB* y *vagCD* los más prevalentes (Tabla 23).

Los tamaños de los plásmidos fueron aproximados mediante un modelo de regresión lineal creado con el software Statgraphics (Centurion XVI), que calculó el tamaño del plásmido (TP), en función de la distancia experimental de migración (DM) del marcador de peso molecular (MidRange PFG Marker) en el gel PFGE-S1. El modelo resultante fue  $TP = [521.98 - 241.704 * \ln(\text{Distancia de migración})]$  con  $r^2 = 99.3012$ , con un intervalo de confianza del 95% (error absoluto = 0.05). Ver Anexo 4.

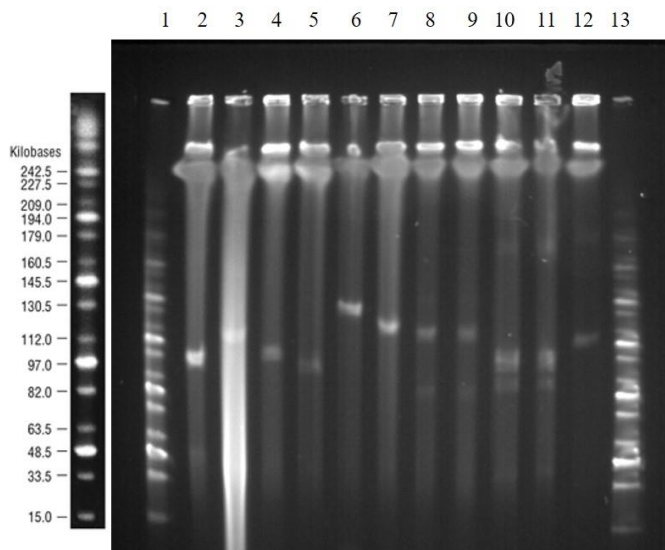
**Tabla 23.** Integrones, tipado de plásmidos y localización de genes en las cepas de *E. coli* BLEE positivas aisladas de portadores humanos.

| Cepa               | Integrones clase 1   |                     | Integrones clase 2       | Caracterización plasmídica     |                      |   |
|--------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|---|
|                    | Región 3' conservada | Estructura genética | Estructura genética      | Replicón                       | Número: tamaño (kb)  | Sistemas de adición                             |
| C7223              | <i>qacEA + sulI</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | FIA, Frep, K                   | 2: 125, 50           | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, vagCD</i>             |
| C7225              | - <sup>b</sup>       | -                   | -                        | <u>FIB</u> , Frep, K           | 1: <u>130</u>        | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, smBC</i>                |
| C7226              | -                    | -                   | -                        | FIB, Frep, K                   | 1: 120               | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, smBC, pndAC</i>         |
| C7230              | -                    | -                   | -                        | FIA, <u>FIB</u> , Frep, K      | 1: <u>155</u>        | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, smBC, pndAC</i>         |
| C7227              | -                    | -                   | -                        | FIB, Frep                      | 2: 180, 8            | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, smBC</i>              |
| C7231              | <i>qacEA + sulI</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | FIB, Frep                      | 2: 150, 90           | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, smBC</i>              |
| C7234              | <i>qacEA + sulI</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | FIB, Frep                      | 2: 150, 90           | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, smBC</i>              |
| C7235              | -                    | -                   | <i>dfrA1-sat2- aadA1</i> | FIB, Frep, K                   | 4: 160, 120, 100, 35 | <i>smBC</i>                                     |
| C7236              | -                    | -                   | <i>dfrA1-sat2- aadA1</i> | FIB, Frep, K                   | 4: 160, 120, 100, 35 | <i>smBC</i>                                     |
| C7224              | <i>qacEA + sulI</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | <u>FIB</u> , Frep, K           | 1: <u>150</u>        | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, smBC</i>                |
| C7239 <sup>a</sup> | <i>qacEA + sulI</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | <b>FIA</b> , <u>FIB</u> , Frep | 1: <b><u>140</u></b> | <b><i>pemKI</i></b> , <i>ccdAB, vagCD, smBC</i> |

Los plásmidos localizados por hibridación están subrayados.

<sup>a</sup> Cepa conjugativa. Los determinantes de resistencia y características transferidas por conjugación a la cepa receptora *E. coli* J53<sup>Rif-R</sup> están marcados en negritas. El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fue localizado en el plásmido IncFIA de 140 kb.

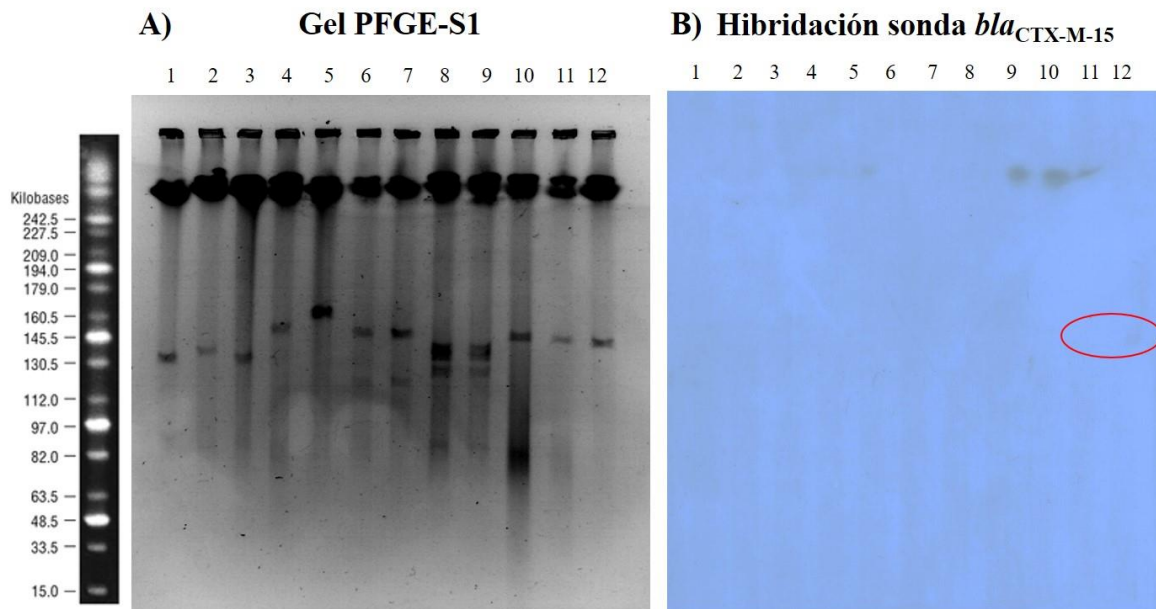
<sup>b</sup> -: Negativo.



**Figura 14.** Gel PFGE-S1 para determinar el número y tamaño de plásmidos en las 11 cepas de *E. coli* aisladas de voluntarios sanos. 1 y 13, MidRange I PFG Marker (New England Biolabs®); 2, C7223; 3, C7224; 4, C7225; 5, C7226; 6, C7227; 7, C7230; 8, C7231; 9, C7234; 10, C7235; 11, C7236; 12, C7239.

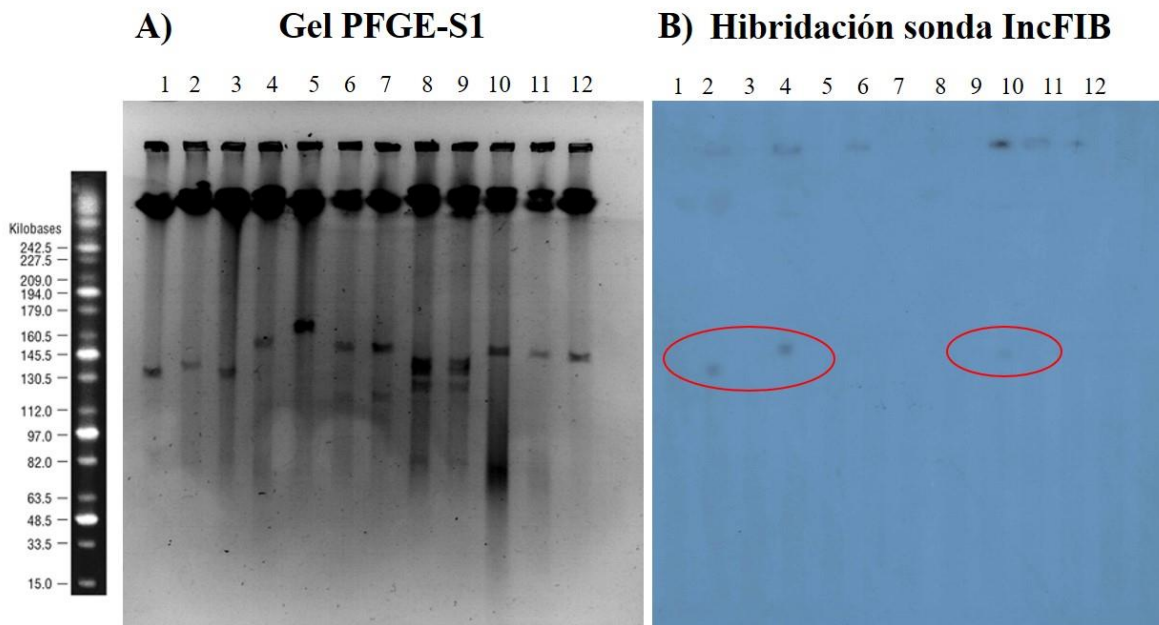
Solamente una de las cepas resultó ser conjugativa, C7239, en la cuál se localizó un plásmido IncFIA de 140 kb que acarrió al gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, mismo que fue detectado por PCR e hibridación tanto en la cepa donadora como en su transconjugate (Figura 15). Así mismo, los genes de resistencia *bla*<sub>OXA-1</sub>, *aac*(6′)-*Ib-cr* y *tet*(B), así como el arreglo genético *drfA17-aadA5* en un integrón de clase 1, fueron co-transferidos por conjugación desde esta cepa, junto con los sistemas de adición *pemKI* y *srnBC* (Tabla 23). De igual modo se detectaron plásmidos IncFIB de 150 y 155 kb en dos aislados ST131, así como de 150 kb en la clona ST5079 (Figura 16).





**Figura 15.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de portadores humanos y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup>P.

| Carril      | Tamaño del plásmido localizado |
|-------------|--------------------------------|
| 1: C7223    | -                              |
| 2: C7225    | -                              |
| 3: C7226    | -                              |
| 4: C7230    | -                              |
| 5: C7227    | -                              |
| 6: C7231    | -                              |
| 7: C7234    | -                              |
| 8: C7235    | -                              |
| 9: C7236    | -                              |
| 10: C7224   | -                              |
| 11: C7239   | 140 kb                         |
| 12: TcC7239 | 140 kb                         |



**Figura 16.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de portadores humanos y de las transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda del replicón FIB marcada con  $^{32}\text{P}$ .

| Carril      | Tamaño del plásmido localizado |
|-------------|--------------------------------|
| 1: C7223    | -                              |
| 2: C7225    | 130 kb                         |
| 3: C7226    | -                              |
| 4: C7230    | 155 kb                         |
| 5: C7227    | -                              |
| 6: C7231    | -                              |
| 7: C7234    | -                              |
| 8: C7235    | -                              |
| 9: C7236    | -                              |
| 10: C7224   | 150 kb                         |
| 11: C7239   | -                              |
| 12: TcC7239 | -                              |

## Discusión

En el presente trabajo se detectó una alta tasa de cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> en portadores humanos (18%) dentro de un área específica, resaltando el interés del estudio por la resistencia antimicrobiana en la comunidad. Las cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> fueron multirresistentes y productoras de BLEE; estos aislados albergaron a la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 o CTX-M-14, mismas que en recientes años, han sido detectadas en aislados fecales de humanos sanos en algunos países como España, Túnez, China o los Países bajos (Vinué *et al.*, 2009; Ben Sallem *et al.*, 2012b; Zhang *et al.*, 2015; den Reijer *et al.*, 2016). Sin embargo, existen muy pocos trabajos en América, uno para ser precisos, que reporta *E. coli* productoras de BLEE en humanos sanos (Pallecchi *et al.*, 2007).

La BLEE CTX-M-14 es el resultado de la convergencia de dos genes, *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> (Navarro *et al.*, 2007); ambas variantes fueron detectadas en este estudio: una cepa asignada al ST648 y cuatro pertenecientes a los nuevos ST5080 y ST5081, destacando la potencial diseminación de esta BLEE hacia la comunidad en STs que no habían sido reportados.

En este trabajo, cuatro cepas de *E. coli* productoras de BLEE y resistentes a fluoroquinolonas, fueron asignadas al filogrupo B2 y al grupo clonal ST131. Cepas ST131-B2 han sido reportadas principalmente en muestras clínicas (Mora *et al.*, 2014; Olesen *et al.*, 2014), muestras fecales de humanos sanos (den Reijer *et al.*, 2016) o incluso del suelo (Ben Said *et al.*, 2015); pero en México, la clona ST131-B2-O25 sólo ha sido reportada en aislados clínicos causantes de infecciones del tracto urinario (Molina-López *et al.*, 2011; Reyna-Flores *et al.*, 2013). La serotipificación y la subtipificación del gen *fimH* en las cepas ST131-B2 permitió detectar a la subclona ST131-B2-O25:H4-H30-Rx, que es reconocida por incrementar las tasas de morbilidad, mortalidad e incluso de costos en el área clínica y comunitaria (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). La mayoría de los aislados ST131 pertenecen al serotipo O25:H4 y está comúnmente relacionado con altas tasas de virulencia; sin embargo, en este estudio no se detectaron genes de virulencia encontrados de manera habitual en *E. coli* patógenas intestinales, hecho que podría estar relacionado con la detección de esta clona en sujetos aparentemente sanos, sugiriendo un origen comensal de este grupo clonal con la subsecuente adquisición de factores de virulencia en el transcurso del tiempo, aunque

no se descarta la presencia de genes extraintestinales en *E. coli* STS131, ya que este grupo clonal es reconocido por ser altamente virulento (Mora *et al.*, 2014; Olesen *et al.*, 2014).

Por otro lado, diferentes genes de resistencia fueron identificados entre las 11 cepas de *E. coli* BLEE positivas, reflejando las implicaciones que puede tener una posible exposición no controlada en la comunidad hacia los antimicrobianos en México. También se detectaron estructuras genéticas en integrones de clase 1 y 2, lo que sugiere a estos elementos movilizables como posibles vehículos para la diseminación de genes de resistencia entre aislados de *E. coli* de origen humano.

Genes de resistencia y módulos de adicción son comúnmente acarreados de manera eficiente por plásmidos conjugativos, promoviendo su rápida diseminación entre diferentes especies bacterianas (Ruiz *et al.*, 2012; Hammerum *et al.*, 2014). La caracterización plasmídica mostró la presencia de los replicones IncFIA, IncFIB, IncFrep e IncK con diferentes tamaños. De este grupo de cepas sólo C7239 fue conjugativa, de la cual se logró transferir un plásmido IncFIA de 140kb que albergó al gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Este gen es uno de los más frecuentes en *E. coli* de origen clínico y generalmente está localizado en plásmidos conjugativos tipo F de bajo rango de hospedero, que pueden facilitar su propagación, si bien no en diferentes géneros bacterianos, sí en diferentes ambientes (Blanco *et al.*, 2009). Este gen fue co-transferido con los genes *aac(6')-Ib-cr* y *tet(B)*, así como con los genes cassettes *dfrA17-aadA5*. También se detectaron plásmidos IncFIB de 130 y 155kb en los aislados ST131 C7225 y C7230, respectivamente; pero ninguno de estos plásmidos albergó al gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Las cepas estudiadas albergaron múltiples sistemas de adicción plasmídicos, siendo *pemKI*, *srnBC*, *ccdAB* y *vagCD* los más prevalentes; sin embargo, sólo *pemKI* y *srnBC* fueron transferidos por conjugación desde la cepa C7239, sugiriendo que estos sistemas podrían estar implicados en el mantenimiento del plásmido conjugativo de 140 kb en esta cepa.

La transferencia de *E. coli* productoras de BLEE o de plásmidos entre animales y humanos en diferentes ambientes es un fenómeno que puede ser recurrente (Hammerum *et al.*, 2014); en este trabajo se evidenció la diseminación clonal de los nuevos ST5080 y ST5081 que portaban el gen *bla*<sub>CTX-M-14a</sub> o *bla*<sub>CTX-M-14b</sub> entre cuatro familiares que vivían en la misma casa al momento de la recolección de la muestra, por lo que la transferencia de estas clonas en el hogar es una posibilidad. La subclona ST131-B2-O25:H4-H30-Rx también se diseminó entre

dos miembros de una familia, lo que pone de manifiesto a esta clona como un patógeno latente albergado en portadores humanos en el ambiente comunitario.

El estudio de estas cepas permitió escribir el reporte titulado:

**“ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans in México, including the subclone ST131-B2-O25:H4-H30-Rx”**, que ha sido sometido para publicación en la revista *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Ver anexo 5.

#### 4. PACIENTES PEDIÁTRICOS

##### Resultados

De los 26 pacientes pediátricos, se recuperó una cepa de *E. coli* por muestra; sin embargo, algunas muestras fueron obtenidas del mismo paciente, ya sea de diferente sitio anatómico o en diferente fecha (Tabla 24), por lo que en total se obtuvieron 36 cepas de *E. coli* a partir de los 26 pacientes; sólo 11 de ellas (30.5%) fueron resistentes a cefotaxima y a más de un antimicrobiano de las diferentes familias de antimicrobianos evaluados, por lo que se procedió a caracterizarlas completamente (Tabla 24). Estas 11 *E. coli* CTX<sup>R</sup> fueron aisladas de 7 pacientes: en 3 de ellos se obtuvieron en total 7 muestras, por lo que cada bacteria aislada por muestra se caracterizó de manera independiente (7 cepas); mientras que de los otros 4 pacientes se aisló una sola *E. coli* por muestra (4 cepas) (Tabla 24). Todas las cepas fueron multirresistentes y fenotípicamente productoras de BLEEs, por lo que fueron sometidas a la detección de genes de resistencia.

**Tabla 24.** Muestras de las cuales se aislaron las 11 cepas de *E. coli* multirresistentes de origen clínico.

| No. de muestra         | Fecha de aislamiento (día/mes/año) | Origen                         | Paciente            |             | Cepa aislada |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------|--------------|
|                        |                                    |                                | Género <sup>a</sup> | Edad (años) |              |
| 100114 <sup>1</sup>    | 17/01/2010                         | Diálisis peritoneal            | F                   | 17.1        | C4425        |
| 100120 <sup>1</sup>    | 22/01/2010                         | Diálisis peritoneal            | F                   | 17.1        | C4426        |
| 100222 <sup>1</sup>    | 15/02/2010                         | Diálisis peritoneal            | F                   | 17.1        | C4427        |
| 1004952-1 <sup>2</sup> | 29/04/2010                         | Bazo (post-mortem)             | F                   | 8           | C4428        |
| 1004950-1 <sup>2</sup> | 29/04/2010                         | pulmón Izquierdo (post-mortem) | F                   | 8           | C4429        |
| 100504-1 <sup>3</sup>  | 05/05/2010                         | Diálisis peritoneal            | M                   | 2.8         | C4430        |
| 100510-2 <sup>3</sup>  | 08/05/2010                         | Diálisis peritoneal            | M                   | 2.8         | C4431        |
| 100325-1               | 18/06/2010                         | Exudado vulvar                 | F                   | 8           | C4432        |
| 100816-2               | 08/08/2010                         | Absceso de pared abdominal     | M                   | 15          | C4433        |
| 100935-2               | 22/09/2010                         | Líquido peritoneal             | F                   | 0.1         | C4435        |
| 110117-1               | 24/01/2011                         | Líquido peritoneal             | M                   | 2           | C4436        |

<sup>1, 2, 3</sup>: muestras obtenidas del mismo paciente, respectivamente.

<sup>a</sup>: F, femenino; M, masculino

En las 11 cepas de *E. coli* se detectó el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa OXA-1 y en 9 de ellas también se detectó la presencia de la BLEE CTX-M-15; así como las enzimas TEM-1 y SHV-2a simultáneamente en 2 aislados OXA-1 positivos (Tabla 25). De igual manera se detectaron genes de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y tetraciclina, siendo las acetilasas Aac(3)-II y Aac(6')-Ib-cr, así como los genes *tet(A)* y *tet(B)* los más frecuentes para cada grupo de antimicrobianos (Tabla 26). Las *E. coli* recuperadas del mismo paciente pertenecieron al mismo grupo filogenético (D o A), así como al mismo ST (ST69, ST44 o ST656), por lo que sólo una cepa de cada grupo (en otras palabras de cada paciente), fue sometida a la determinación de patrón PFGE-*XbaI*. Se obtuvieron 7 patrones de campos pulsados, es decir, 7 pulsotipos (Figura 17). La cepa C4435 recuperada de líquido peritoneal de un paciente de género femenino, perteneció al grupo filogenético B2 y al ST131; de igual manera para las cepas C4436, C4432 y C4433 se identificaron los ST58, ST90 y ST167 y pertenecieron a los filogrupos B1, C y A, respectivamente (Tabla 25). Así mismo, se detectó la presencia de un integrón de clase 1 con la misma estructura genética (*dfrA17-aadA5*) en todos los aislados, así como un integrón de clase 2 (*dfrA1-sat2-aadA1*) en los aislados C4435 y C4436, que fueron obtenidos de diferente paciente (Tabla 26). Por otro lado, sólo en 2 aislados con ST90 (C4432) y ST58 (C4436) se identificaron mutaciones puntuales en la región reguladora del gen cromosomal *ampC*, responsable de la resistencia al  $\beta$ -lactámico cefoxitina; mientras que en 9 y 6 de las 11 cepas se detectaron cambios aminoacídicos en las proteínas GyrA y ParC, respectivamente, asociadas a la resistencia cromosómica a quinolonas (Tabla 26).

La caracterización plasmídica permitió identificar a los replicones FIA, FIB, II y N entre todos los aislados, con diferente tamaño (Figura 18), calculado como se indica en el anexo 4; así como al menos 4 sistemas de adicción diferentes en cada uno de los aislados, siendo *ccdAB*, *vagCD*, *hok-sok* y *pemKI*, los más prevalentes (Tabla 25). Cabe mencionar que la banda cerca del pozo en los genes PFGE-S1 es considerada como remanente de ADN genómico (Figuras 18 y 19).

**Tabla 25.** Origen, tipado molecular,  $\beta$ -lactamasas identificadas y caracterización plasmídica de las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs aisladas de pacientes pediátricos.

| Cepa         | Origen                       | Paciente<br>Género <sup>a</sup> /Edad <sup>b</sup> | Grupo<br>filogenético | ST/<br>Complejo<br>ST | $\beta$ -lactamasas<br>detectadas          | Caracterización plasmídica          |   |  |
|--------------|------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|--|-------------------------------------|---|--|
|              |                              |  |                       |                       |  | Replicón                            | Número: tamaño (kb)                                   | Sistemas de adición                                      |
| C4425        | Diálisis peritoneal          | F/17.1   | D                     | 69/69                 | CTX-M-15, OXA-1                            | FIA                                 | 1: 150  | <i>vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i>                 |
| <b>C4426</b> |                              |  | D                     |                       | <b>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1</b>         | <b>FIA, FIB<sup>d</sup></b>         | 3: 120, 130, <b>135<sup>d</sup></b>                   | <b><i>vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i></b>          |
| <b>C4427</b> |                              |  | D                     |                       | <b>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1</b>         | <b>FIB<sup>d</sup></b>              | 1: <b>135<sup>d</sup></b>                             | <b><i>vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i></b>          |
| C4428        | Bazo (post-mortem)           | F/8  | A                     | 44/10                 | CTX-M-15, OXA-1                            | FIA, FIB                            | 1: <u>140</u>   | <i>vagCD, ccdAB, pemKI, srnBC</i>                        |
| C4429        | Pulmón derecho (post-mortem) |  | A                     |                       | <u>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1</u>         | <u>FIB<sup>d</sup></u>              | 5: 15, 85, 170, 175, <u>190<sup>d</sup></u>           | <i>vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i>                 |
| C4430        | Diálisis peritoneal          | M/2.8  | A                     | 656/10                | OXA-1, TEM-1b, SHV2a                       | FIB                                 | 7: 20, 130, 165, <u>200</u> , 235, 280, 300           | <i>hok-sok, vagCD, relBE, ccdAB</i>                      |
| <b>C4431</b> |                              |  | A                     |                       | <b>OXA-1, TEM-1b, SHV2a</b>                | <b>FIA, FIB</b>                     | 9: 20, <b>140</b> , 175, 210, 245, 280, 315, 345, 385 | <b><i>hok-sok, vagCD, relBE, ccdAB</i></b>               |
| C4432        | Diálisis peritoneal          | F/8  | C                     | 90/23                 | <u>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1</u>         | 11, FIA, <u>FIB<sup>a</sup></u> , N | 5: 30, 40, <u>140<sup>d</sup></u> , 160, 250          | <i>pndAC, vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i>          |
| <b>C4433</b> | Absceso pared abdominal      | M/15   | A                     | 167/10                | <b>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1</b>         | <b>FIB<sup>d</sup>, N</b>           | 2: 110, <b>190<sup>d</sup></b>                        | <b><i>hok-sok, vagCD, relBE, ccdAB, pemKI, srnBC</i></b> |
| C4435        | Líquido peritoneal           | F/0.1  | B2                    | 131/131 <sup>c</sup>  | CTX-M-15 <sup>d</sup> , OXA-1              | FIB <sup>d</sup>                    | 1: <u>130<sup>d</sup></u>                             | <i>hok-sok, pndAC, vagCD, relBE, ccdAB, pemKI</i>        |
| <b>C4436</b> | Líquido peritoneal           | M/2  | B1                    | 58/155                | <b>CTX-M-15<sup>d</sup>, OXA-1, TEM-1b</b> | <b>FIB<sup>d</sup>, 11</b>          | 2: <b>140<sup>d</sup>, 350</b>                        | <b><i>pndAC, relBE, ccdAB, srnBC</i></b>                 |

<sup>a</sup>: F, femenino; M, masculino.

<sup>b</sup>: Edad en años.

<sup>c</sup>: El antígeno somático y flagelar, así como la variante del alelo *fimH* fueron determinados sólo en el aislado ST131: O25:H4/35.

Las cepas conjugativas,  $\beta$ -lactamasas y determinantes plasmídicos transferidos por conjugación a las cepas receptoras *E. coli* C600<sup>Rif-R</sup>, *E. coli* J53<sup>Rif-R</sup> o *E. coli* J53<sup>Azi-R</sup>, están marcados en negritas.

<sup>d</sup>: Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el tipo de plásmido donde fue localizado por hibridación.

Las  $\beta$ -lactamasas y plásmidos asociados detectados por hibridación están subrayados.



Tabla 26. Otros mecanismos de resistencia en las cepas de *E. coli* BLEEs positivas de origen clínico.

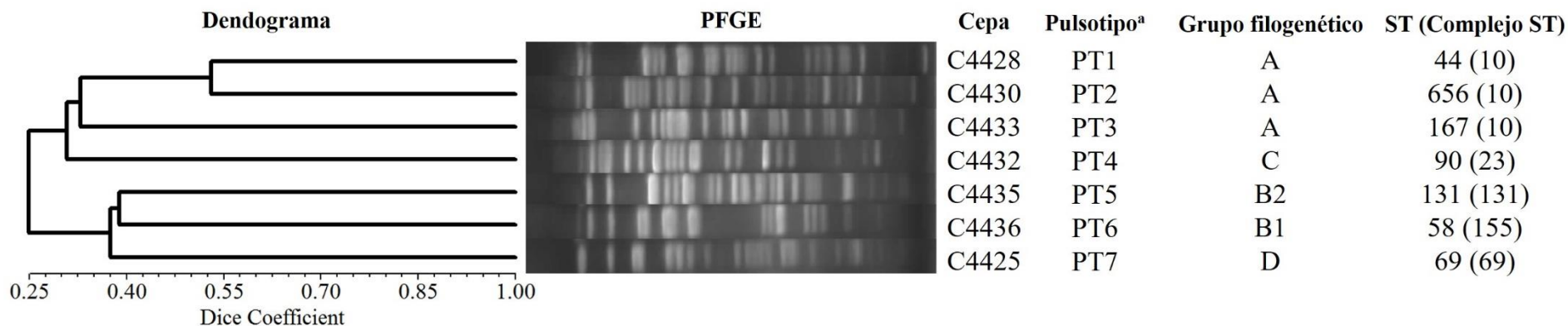
| Cepa         | Resistencia a no $\beta$ -lactámicos <sup>a</sup> | Genes de resistencia a no $\beta$ -lactámicos   | Integrones clase 1   |                     | Integrones clase 2       | Mutaciones cromosomales en el gen <i>ampC</i> | Cambio de aminoácidos <sup>c</sup> |             |
|--------------|---|---|----------------------|---------------------|--------------------------|---|------------------------------------|-------------|
|              |   |   | Región 3' conservada | Estructura genética | Estructura genética      |   | <i>gyrA</i>                        | <i>parC</i> |
| C4425        | NA, CIP, AK, GM, T, TE                            | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(A)</i>         | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | . <sup>b</sup>           | Wild  | S83L                               | Wild        |
| <b>C4426</b> | NA, CIP, AK, GM, T, TE                            | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(A)</i>         | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L                               | D111N       |
| <b>C4427</b> | NA, CIP, AK, GM, T, TE                            | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(A)</i>         | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L                               | D111N       |
| C4428        | NA, CIP, T, C, TE, SXT                            | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(B)</i>         | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L, D87N                         | S80I        |
| C4429        | NA, CIP, AK, GM, S, T, TE, SXT                    | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(B)</i>         | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L, D87N                         | S80I        |
| C4430        | NA, CIP, FOX, AK, S, T, TE, SXT                   | <i>aac(3)-II, tet(B)</i>                        | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L, D87N                         | Wild        |
| <b>C4431</b> | NA, CIP, S, TE, SXT                               | <i>tet(B)</i>                                   | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L, D87N                         | Wild        |
| C4432        | NA, CIP, AK, GM, T, C, TE, SXT                    | <i>aac(6')-Ib-cr, tet(A), tet(B)</i>            | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | -18, -1, +58                                  | Wild                               | Wild        |
| <b>C4433</b> | NA, CIP, GM, S, T, C, TE, SXT                     | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II, tet(A), tet(B)</i> | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | -                        | Wild  | S83L, D87N                         | S80I        |
| C4435        | AK, GM, T   | <i>tet(A)</i>                                   | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | <i>dfrA1-sat2- aadA1</i> | Wild  | Wild                               | Wild        |
| <b>C4436</b> | NA, CIP, AK, GM, S, T, TE                         | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3)-II</i>                 | <i>qacEA + sul1</i>  | <i>dfrA17-aadA5</i> | <i>dfrA1-sat2- aadA1</i> | -18, -1, +58                                  | S83L, D87N                         | S80I, E84V  |

<sup>a</sup>: NA, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino; GM, gentamicina; T, tobramicina; S, estreptomycin; C, cloranfenicol; SXT, trimetoprim/sulfametoxazol; TE, tetraciclina. Los puntos de corte para los agentes antimicrobianos se interpretaron de acuerdo al CLSI, 2015.

<sup>b</sup>: Negativo.

<sup>c</sup>: Sustituciones aminoacídicas. S, serina; L, leucina; D, ácido aspártico; N, asparagina; I, isoleucina; V, valina; E, ácido glutámico.

Las cepas conjugativas y genes de resistencia transferidos por conjugación a las cepas receptoras *E. coli* C600<sup>Rif-R</sup>, *E. coli* J53<sup>Rif-R</sup> o *E. coli* J53<sup>Azi-R</sup>, están marcados en negritas.

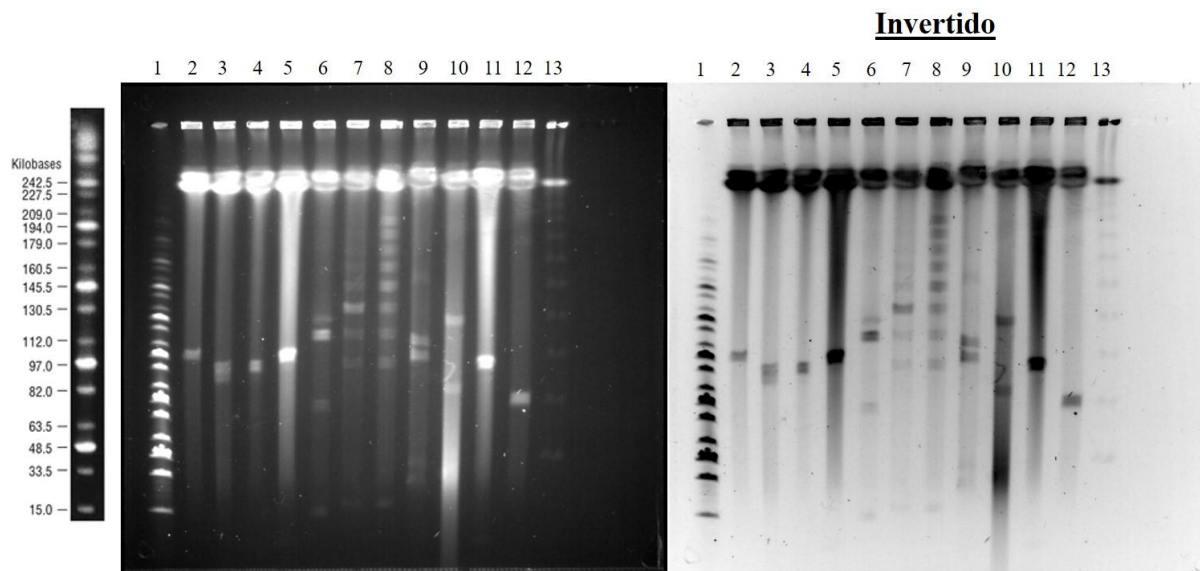


**Figura 17.** Dendrograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión genómica-*Xba*I y tipado molecular de las cepas de *E. coli* productoras de BLEEs recuperadas de pacientes pediátricos.

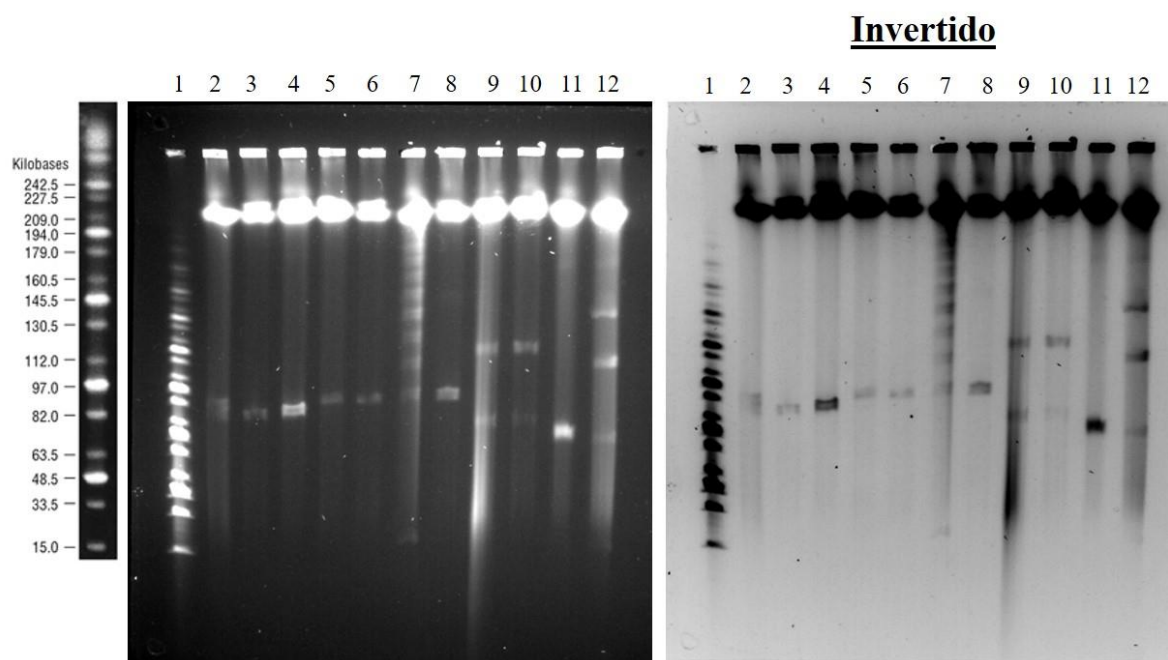
<sup>a</sup>: Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice (valor > 85%).

Los ensayos de conjugación demostraron la transferencia de diferentes genes de resistencia, replicones y sistemas de adicción plasmídicos en 5 de las 11 cepas. La BLEE CTX-M-15, así como genes de resistencia a quinolonas [*aac(6')*-*lb-cr*], aminoglucósidos [*aac(3)-II*] y tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*] fueron transferidos en 4 aislados (C7726, C4427, C4433 y C4436). Mientras que los genes de resistencia *bla*<sub>TEM-1b</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub> y *tet(B)* fueron transferidos en el otro aislado (C4431) (Tablas 25 y 26). En todas las transconjugantes se determinó el tipo y tamaño del plásmido transferido (Figura 19), con el modelo estadístico descrito en el anexo 4.

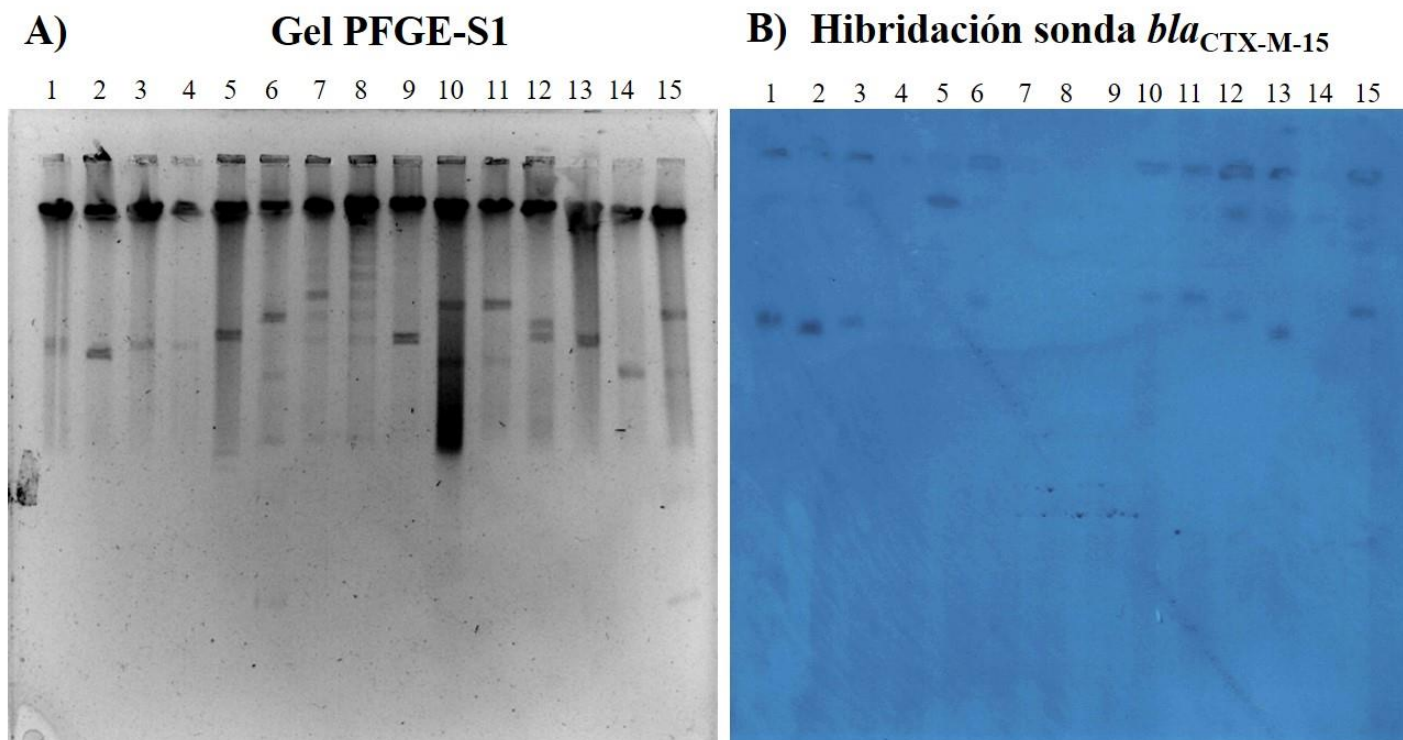
Con los experimentos de hibridación se detectó el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en 7 cepas (4 conjugativas y 3 no conjugativas), acarreado por un plásmido IncFIB de 130 y 140 kb (no conjugativos), así como de 135, 140 o 190 kb (conjugativos) (Tabla 25, Figuras 20 y 21).



**Figura 18.** PFGE-S1 de las cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de muestras clínicas, para determinar el número y tamaño de plásmidos. 1, marcador MidRange I PFG Marker (New England Biolabs); 2, C4425; 3, C4426; 4, C4427; 5, C4428; 6, C4429; 7, C4430; 8, C4431; 9, C4432; 10, C4433; 11, C4435; 12, C4436; 13, marcador (CHEF DNA Size Standard, Lambda ladder, BIO-RAD®).

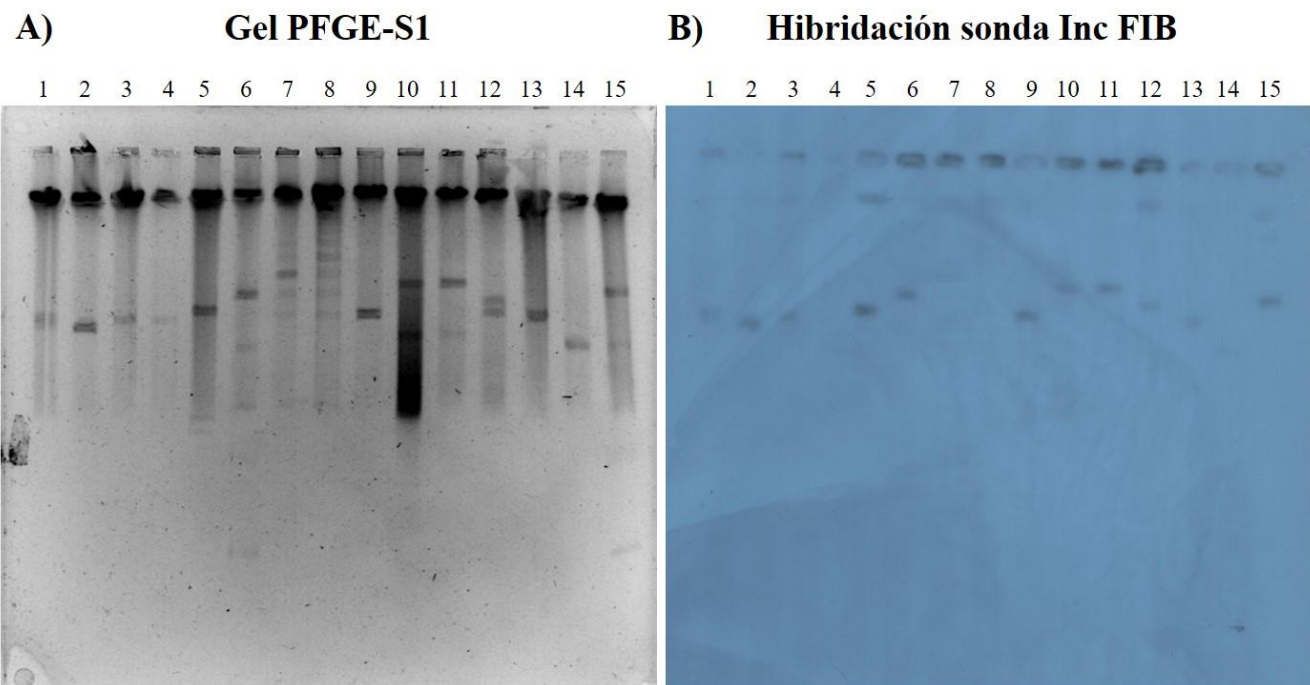


**Figura 19.** PFGE-S1 de las cepas de *E. coli* CTX<sup>R</sup> conjugativas aisladas de muestras clínicas y sus transconjugantes, para determinar el número y tamaño de plásmidos. 1, marcador MidRange I PFG Marker (New England Biolabs); 2, C4426; 3, TcC4426/C600; 4, TcC4426/J53<sup>Rif-R</sup>; 5, C4427; 6, TcC4427/C600; 7, C4431; 8, TcC4431/J53<sup>Azi-R</sup>; 9, C4433; 10, TcC4433/J53<sup>Rif-R</sup>; 11, C4436; 12, TcC4436/J53<sup>Rif-R</sup>.



**Figura 20.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de pacientes pediátricos y de sus transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda *bla*<sub>CTX-M-15</sub> marcada con <sup>32</sup>P. Se observa el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> localizado en plásmidos de diferentes tamaños, que se indican abajo.

| Carril                          | Tamaño del plásmido localizado |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1: C4426                        | 135                            |
| 2: TcC4426/J53RIF <sup>R</sup>  | 125                            |
| 3: C4427                        | 135                            |
| 4: TcC4427/C600                 | 135                            |
| 5: C4428                        | -                              |
| 6: C4429                        | 190                            |
| 7: C4430                        | -                              |
| 8: C4431                        | -                              |
| 9: CTcC4431/J53AZI <sup>R</sup> | -                              |
| 10: C4433                       | 190                            |
| 11: TcC4433/J53RIF <sup>R</sup> | 190                            |
| 12: C4432                       | 140                            |
| 13: C4435                       | 130                            |
| 14: C4436                       | -                              |
| 15: TcC4436/J53RIF <sup>R</sup> | 140                            |



**Figura 21.** A) Gel PFGE-S1 mostrando los plásmidos de las cepas aisladas de pacientes pediátricos y de sus transconjugantes. B) Autorradiografía de hibridación con la sonda con la sonda del replicón FIB marcada con  $^{32}\text{P}$ .

| Carril                          | Tamaño del plásmido localizado |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1: C4426                        | 135                            |
| 2: TcC4426/J53RIF <sup>R</sup>  | 125                            |
| 3: C4427                        | 135                            |
| 4: TcC4427/C600                 | -                              |
| 5: C4428                        | 140                            |
| 6: C4429                        | 190                            |
| 7: C4430                        | 200                            |
| 8: C4431                        | -                              |
| 9: CTcC4431/J53AZI <sup>R</sup> | 140                            |
| 10: C4433                       | 190                            |
| 11: TcC4433/J53RIF <sup>R</sup> | 190                            |
| 12: C4432                       | 140                            |
| 13: C4435                       | 130                            |
| 14: C4436                       | -                              |
| 15: TcC4436/J53RIF <sup>R</sup> | 180                            |

## Discusión

Se ha reportado que la mayoría de las infecciones hospitalarias ocurren en el área de cuidados intensivos; sin embargo, hasta un 30% de infantes llega a enfermarse fuera del nosocomio (Logan *et al.*, 2014). Como se ha reportado en otros estudios, la mayoría de los pacientes que son infectados con organismos productores de BLEEs como es el caso de *E. coli*, han recibido tratamiento previo con cefalosporinas y/o han permanecido por periodos largos de tiempo en el nosocomio, incrementando con esto las posibilidades de crear presión selectiva o de adquirir una clona resistente durante la estancia hospitalaria (Benner *et al.*, 2014). En el caso de estos pacientes, ellos fueron ingresados al hospital por la infección que cursaban, por lo que la adquisición de la bacteria dentro del hospital podría parecer un hecho poco probable. Sin embargo, en el caso de los pacientes a los que se les practicó la diálisis peritoneal, la presencia de *E. coli* pudo ser un evento oportunista, ya que esta bacteria pudo filtrarse durante el procedimiento quirúrgico y causar alguna complicación. Aunque cabe resaltar que las cepas obtenidas de este tipo de muestra, pertenecieron a diferentes grupos filogenéticos (D, A, C, B1, B2) y a diferente ST, llamando la atención la cepa ST131, recuperada de líquido peritoneal en una bebé de escaso un mes de edad, por lo que pudiera pensarse que esta clona sí pudo ser adquirida durante la estancia hospitalaria, ya que es muy poco probable que la niña fuera portadora de esta clona a tan temprana edad, a diferencia de pacientes adultos aparentemente sanos, en los que sí se ha demostrado la presencia de esta clona. Esta ST131 resultó ser resistente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclina; y dado que a la paciente sólo se le estaban administrando  $\beta$ -lactámicos, la presión selectiva a los demás antimicrobianos queda descartada; además, la presencia de la CTX-M-15 en esta cepa, que es un marcador epidemiológico de resistencia a  $\beta$ -lactámicos y a otros antibióticos, puede ser portada en plásmidos que lleven información genética de resistencia a otros antibióticos que pueden ser co-seleccionados, aunque esta cepa no fue conjugativa, lo que apoya la teoría de una potencial diseminación clonal dentro del hospital. Aunque para asegurar este hecho, se debería hacer un estudio más detallado, a fin de detectar y monitorear a esta clona en un periodo más largo de tiempo. Esta cepa ST131 no fue conjugativa; sin embargo, se logró detectar por hibridación la presencia de un plásmido IncFIB de 130 kb que albergó al gen que codifica para la BLEE CTX-M-15. Esta cepa perteneció al serotipo O25:H4 y a la variante 35 del gen *fimH*, que se ha asociado con la producción de CTX-M-15; y curiosamente esta cepa no fue resistente a la

fluoroquinolona evaluada (ciprofloxacino), a diferencia de lo que se reporta para la variante 30 de *fimH*, que sí se ha visto asociada a la resistencia a fluoroquinolonas (Mathers *et al.*, 2015). La mayoría de los aislados ST131 son multidrogo resistentes, pertenecen al serotipo O25:H4 y albergan plásmidos de tipo IncF, que a su vez acarrean al gen *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Estas cepas han sido recuperadas tanto del ambiente hospitalario como de la comunidad e incluso de animales de compañía, pero hasta ahora no se han visto relacionadas con brotes hospitalarios (Mathers *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha propuesto que la adquisición de determinantes de virulencia como *afa/draBC*, el operón *afa*, *iron*, *sat*, *ibeA*, *papGII*, *cnf1*, *hlyA*, *papGIII*, *cdtB* o *neuC-K1* (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014) en ST131 es un evento previo al desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, haciendo que esta clona haya emergido sigilosamente, primero adquiriendo genes asociados a su capacidad de causar infección en humanos y luego dotándose de un arsenal de resistencia antimicrobiana que ha impulsado su expansión masiva en la población de todo el mundo (Ben Zakour *et al.*, 2016). En la cepa ST131 identificada en este grupo de cepas no se detectaron genes de virulencia clásicos de una *E. coli* intestinal; sin embargo, la búsqueda de genes de resistencia extra intestinales es una perspectiva de este trabajo. En este sentido, las clonas de alto riesgo han adquirido atributos adaptativos que incrementan su patogenicidad y habilidades de sobrevivencia, que son acompañados por la adquisición de genes de resistencia. Estas clonas tienen la tenacidad y flexibilidad para conservar y de alguna manera compartir genes de virulencia a otros aislados, por algún otro mecanismo diferente a la conjugación, como puede ser un evento de transformación (Mathers *et al.*, 2015), que es lo que podría pasar en esta cepa ST131 (C4435) no conjugativa. Este tipo de clonas también han contribuido a la diseminación global de la resistencia antimicrobiana a través de la transferencia de diferentes tipos de plataformas genéticas como los plásmidos e integrones.

En este sentido, las cepas productoras de BLEEs representan un serio problema en este grupo de pacientes pediátricos, ya que por sus condiciones inmunológicas, son más susceptibles de adquirir una infección y que al ser causada por una bacteria multirresistente, el panorama sea más desalentador, pudiendo incluso causar la muerte, como sucedió con la paciente de 8 años de la cual se aisló la bacteria multirresistente *E. coli* ST44 a partir de cultivos post-mortem, que fue productora de la BLEE CTX-M-15 acarreada por un plásmido FIB de 140 kb, y con mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos, poniendo en evidencia la diseminación de esta BLEE en el entorno hospitalario. Las  $\beta$ -lactamasas tipo CTX-M son las más frecuentes

entre aislados nosocomiales y de la comunidad y su detección se ha visto incrementada durante la última década. Actualmente, su diseminación es global entre diferentes bacterias, siendo especialmente frecuente en *E. coli*. También se han caracterizado *E. coli* productoras de CTX-M-14 causantes de brotes neonatales, asociadas al ST23 y al filogrupo A, que se han reportado con mayor frecuencia en adultos, lo que sugiere una posible diseminación y adaptación de esta y otras clonas entre hospederos de diferentes edades (Oteo *et al.*, 2012), siendo posiblemente los adultos quienes inicien la diseminación. *E. coli* ST38 y ST69 son algunas de las clonas multiresistentes más comúnmente asociadas a la producción de BLEEs, por lo que incrementan las tasas de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Se ha observado que estas clonas pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo y que juegan un papel importante en la transferencia horizontal de determinantes de resistencia hacia otras bacterias, actuando como eficientes donadores y/o receptores genéticos. En este trabajo se detectó la clona ST69 en 3 cepas de *E. coli* aisladas de una misma paciente pero en diferente periodo de tiempo. Al tener el mismo ST se pensaría que la misma bacteria estuvo latente en el paciente durante ese mes en el que se obtuvieron las muestras (Tabla 24), por lo que el tratamiento administrado fue ineficaz; sin embargo, genéticamente se encontraron algunas diferencias entre las 3 cepas de *E. coli*, específicamente en cuanto a la presencia de replicones. En la bacteria aislada de la primer muestra no se detectó el replicón FIB de 135 kb, hecho que se demostró tanto por PCR como por la hibridación específica con esa sonda, sugiriendo una adquisición posterior de este plásmido por las cepas aisladas en las dos muestras posteriores. Es curioso notar que en la cepa obtenida de la segunda muestra se detectaron 2 plásmidos más (de 120 y 130 kb) en comparación a la primera y a la tercera toma de muestra. De igual manera, llama la atención que en la *E. coli* aislada de la tercera muestra ya no se detectó el replicón IncFIA; sin embargo, no se observaron cambios en cuanto al contenido de genes de resistencia entre las cepas, por lo que se piensa que este plásmido (FIA) no alberga determinantes de resistencia y que pudo perderse a medida que pasó el tiempo desde la primer toma de muestra. Tampoco se observaron cambios en los sistemas de adicción identificados, ya que fueron los mismos en las 3 cepas, lo que sugiere el uso de los mismos sistemas en los plásmidos detectados. Con todo esto, se pudo evidenciar cierta variabilidad plasmídica dentro de una misma clona en un periodo corto de tiempo (1 mes).

La resistencia hacia los antibióticos comúnmente prescritos a niños con infecciones de tracto urinario (ITU) y que son causadas por *E. coli*, es relativamente alta, particularmente en países



en vías de desarrollo. Se estima que *E. coli* es responsable de hasta el 80% de las ITU y es también la causa más común de bacteremia y de infecciones asociadas a los alimentos, que entre otras cosas, pueden llegar incluso a causar meningitis en neonatos (Bryce *et al.*, 2016). Hasta un 67% de las enfermedades urológicas son causadas por *E. coli* en algunos países como Korea, seguidas por *K. pneumoniae* (33%) (Lee *et al.*, 2013).

Las tasas de infecciones causadas por *E. coli* en Latino América son mayores que en los países desarrollados. Aproximadamente una tercera parte de los pacientes pediátricos latinoamericanos que han sido internados en el área de cuidados intensivos han muerto, siendo estas cifras más altas en pacientes con bajo peso o desnutrición (Berezin *et al.*, 2014). Se ha visto que en Latino América hasta un 32% de los aislados de *E. coli* y un 58% de *K. pneumoniae* son productores de BLEEs y que los porcentajes aumentan en países como Guatemala, Honduras y México (Guzmán-Blanco *et al.*, 2014).

En México, el año pasado se reportó la presencia de una cepa de *E. coli* multirresistente productora de CTX-M-15 y TEM-1, causante de ITU en un hospital de referencia de tercer nivel de la Ciudad de México (Hospital General Naval de Alta Especialidad) (Alcántar-Curiel *et al.*, 2015) y también se ha documentado que CTX-M-15 es la BLEE predominante en cepas de *E. coli* dentro de un hospital de tercer nivel en Monterrey, por lo que requiere un cuidadoso monitoreo (Garza-González *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha visto que la prevalencia de genes RQMP [*qnr* y *aac(6')-Ib-cr*] es mucho más baja en aislados pediátricos en comparación a los aislados de adultos en México, mientras que CTX-M-15 es la principal BLEE identificada entre aislados pediátricos (Silva-Sánchez *et al.*, 2013); hecho que contrasta en parte con lo encontrado en este trabajo, ya que aunque la mayoría de los aislados (9 de 11) presentó el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, 8 de ellos también mostraron resistencia a quinolonas, detectándose mecanismos de resistencia tanto plasmídicos como cromosómicos a este grupo de antimicrobianos. Este hecho es interesante porque las quinolonas son muy poco usadas en pediatría, por lo que la presión selectiva no tendría un papel importante, sin embargo, se ha visto que por el fenómeno de co-resistencia, aquellos plásmidos que acarrean a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, generalmente también portan algún gen de resistencia a quinolonas, como es el caso del gen *aac(6')-Ib-cr*, mismo que acetila e inactiva a este grupo de antimicrobianos. Específicamente en la clona ST131, se ha visto que tan pronto como este grupo de antibióticos se introdujo en el tratamiento de infecciones, esta clona presentó resistencia, lo que sigue una clara presión selectiva por parte del

antimicrobiano y una eficiente adaptación de esta clona hacia la acción de este antibiótico (Mathers *et al.*, 2015). En este trabajo, al tratarse de pacientes menores de 17 años de edad, el uso de quinolonas estuvo restringido, debido a los efectos adversos que éstas pueden causar en humanos que todavía están en desarrollo físico, por lo que la presión selectiva hacia este grupo de antimicrobianos no tendría un papel determinante dentro del nosocomio; sin embargo, todas las bacterias aisladas de este hospital presentaron determinantes de resistencia hacia estos antimicrobianos, por lo que una diseminación clonal de la comunidad al hospital pudiera explicar este fenómeno. Así mismo, curiosamente se detectaron genes de resistencia a trimetoprim y estreptomina insertados en integrones clásicos de clase 1 en todos los aislados, así como de clase 2 en las clonas ST131 y ST58, lo que aumenta el perfil de multirresistencia en las cepas aisladas de este hospital pediátrico. Este hecho es interesante porque estos integrones acarrean genes de resistencia que pueden ser transferidos a otras clonas del mismo género o incluso de alguno diferente.

Con el estudio de este grupo de cepas de *E. coli* se puso de manifiesto la alta tasa de multidrogo resistencia en este nosocomio, así como la alta prevalencia de la BLEE CTX-M-15 que es acarreada por plásmidos IncFIB con un rango de tamaño que va de 135 a 190 kb. Estos hallazgos son de importancia debido a que documentan los mecanismos de resistencia presentes en las cepas de *E. coli* que circulan en este hospital, lo que debe alertar a los médicos y al comité de vigilancia para crear un sistema de contención adecuado a corto o mediano plazo.

Los resultados de este grupo de cepas se incluirán en el reporte denominado “**Multidrug-resistance, clonality and high detection of *bla*<sub>CTX-M15</sub> gene in IncFIB plasmids of *Escherichia coli* strains isolated from a Mexican pediatric hospital**”, para someterlo a posible publicación en la revista *Journal of Chemotherapy*.

Tabla 27. Principales características de las *E. coli* CTX<sup>R</sup> aisladas de todos los hospederos en este trabajo.

| Origen             | Cepa  | Filogrupo | MLST            |                | Genes de resistencia a no β-lactámicos    | BLEE/pAmpC detectados                              | Plásmidos                         |  |  |
|--------------------|-------|-----------|-----------------|----------------|---|--|-----------------------------------|--|--|
|                    |       |           | ST              | ST-Cplx        |   |  | Replicón                          | Número: tamaño (kb)                                      | Sistemas de adicción                       |
| Perros sanos       | C7205 | A         | 617             | 10             | <i>aac(6')-Ib-cr, tet(B)</i>              | CTX-M-15 <sup>a</sup>                              | FIB, Frep,                        | 2: 45, <b>150</b> <sup>a</sup>                           | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, srnBC</i>          |
|                    | C7206 | A         | 410             | 23             | <i>aac(6')-Ib-cr</i>                      | CTX-M-15 <sup>a</sup>                              | FIB, Frep, K                      | 1: <u>120</u> <sup>a</sup>                               | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, srnBC</i>          |
|                    | C7207 | A         | 3944            | -              | <i>aac(3)-II, tet(A), sul3</i>            | CTX-M-15 <sup>a</sup> , SHV-2, CMY-2 <sup>b*</sup> | FIB, Frep, K                      | 3: 55, <b>80</b> <sup>a</sup> , <u>130</u> <sup>b*</sup> | <i>pemKI, hok-sok</i>                      |
|                    | C7203 | B1        | 1431            | -              | <i>qnrB19, tet(A)</i>                     | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1, FIB, K                        | 3: 100, 120, <u>150</u> <sup>b</sup>                     | <i>pndAC</i>                               |
|                    | C7204 | D         | 57              | 350            | <i>tet(B), cmlA, sul3</i>                 | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1, FIB, Frep, K                  | 3: 50, <b>105</b> , <u>145</u> <sup>b</sup>              | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i> |
|                    | C7209 | D         | 4565            | -              | -   | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1                                | 3: 80, <b>150</b> <sup>b</sup> , 285                     | <i>ccdAB, pndAC</i>                        |
|                    | C7201 | D         | ND              | ND             | <i>tet(A), cmlA</i>                       | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | FIB, A/C, Frep, K, B/O            | 6: 5, 40, 50, <b>100</b> , <u>135</u> <sup>b</sup> , 210 | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC, relBE</i>   |
|                    | C7208 | A         | 93              | 168            | <i>tet(A), sul3</i>                       | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1, FIB, Frep, K                  | 4: 100, 110, <u>135</u> <sup>b</sup> , 240               | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, srnBC, pndAC</i> |
|                    | C7200 | A         | ND              | ND             | <i>tet(A), tet(B)</i>                     | CMY-2  | I1, N, Frep, K                    | 2: 105, <b>125</b>                                       | <i>ccdAB, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
| Tortugas sanas     | C7210 | D         | 2732            | - <sup>c</sup> | <i>qnrA, aac(3)-II, tet(A), sul3</i>      | CTX-M-2  | I1, FIB, FIC, Frep                | 3: 45, 85, 170   | <i>hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i>        |
|                    | C7212 | D         | 2732            | -              | <i>aac(3)-II, sul3</i>                    | CTX-M-2/ CMY-2                                     | I1, FIB, FIC, Frep                | 4: 85, 120, 165, 220                                     | <i>hok-sok, vagCD, srnBC, pndAC</i>        |
|                    | C7221 | B1        | 58              | 155            | <i>tet(A), sul3</i>                       | CTX-M-15 <sup>a</sup>                              | FIB <sup>a</sup> , Y, Frep, K     | 3: <b>65</b> , <u>120</u> <sup>a</sup> , 145             | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, srnBC</i>        |
|                    | C7215 | B1        | 156             | 156            | <i>aac(3)-II, tet(B), cmlA</i>            | CTX-M-15 <sup>a</sup> , TEM-1                      | I1, FIB, Frep, K                  | 2: 100, <u>135</u> <sup>a</sup>                          | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
|                    | C7222 | B1        | 156             | 156            | <i>qnrB19, OqxB, aac(6')Ib-cr, tet(A)</i> | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1 <sup>b</sup> , FIB, Frep, K    | 3: <b>85</b> <sup>b</sup> , 145, 190                     | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC</i>          |
|                    | C7211 | B1        | 2329            | -              | <i>qnrB19, tet(A)</i>                     | CMY-2  | I1, N, FIB, Frep, K               | 2: 90, 130   | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
|                    | C7214 | B1        | 2329            | -              | <i>qnrB19, tet(A)</i>                     | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | I1, N, FIB <sup>b</sup> , Frep, K | 2: <b>90</b> <sup>b</sup> , <b>130</b>                   | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>        |
|                    | C7218 | B1        | 155             | 155            | <i>tet(A)</i>                             | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | FIB, P, Frep, K, B/O              | 2: 100, <u>125</u> <sup>b</sup>                          | <i>vagCD, srnBC</i>                        |
|                    | C7220 | B1        | 155             | 155            | <i>tet(A)</i>                             | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | FIB, P, Frep, K, B/O              | 2: 100, <u>125</u> <sup>b</sup>                          | <i>vagCD, srnBC</i>                        |
|                    | C7219 | B1        | ND <sup>b</sup> | ND             | <i>qnrA, aac(3)-II, tet(A), tet(B)</i>    | CMY-2 <sup>b</sup>                                 | FIB <sup>b</sup> , Frep, K        | 3: 70, <b>90</b> <sup>b</sup> , <b>195</b>               | <i>ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC</i>          |
| C7216              | A     | ND        | ND              | <i>tet(A)</i>  | CMY-2 <sup>b</sup>                        | FIB, I1, Frep, K                                   | 2: 70, <u>95</u> <sup>b</sup>     | <i>pemKI, hok-sok, vagCD, pndAC</i>                      |  |
| Portadores humanos | C7223 | B2        | 4225            | 131            | <i>aac(6')-Ib-cr, tet(A)</i>              | CTX-M-15, OXA-1                                    | FIA, Frep, K                      | 2: 125, 50   | <i>pemKI, ccdAB, hok-sok, vagCD</i>        |
|                    | C7225 | B2        | 131             | 131            | <i>aac(6')-Ib-cr, tet(A), aac(3')-II</i>  | CTX-M-15, OXA-1                                    | FIB, Frep, K                      | 1: <u>130</u>  | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, srnBC</i>          |
|                    | C7226 | B2        | 131             | 131            | <i>aac(6')-Ib-cr, aac(3')-II</i>          | CTX-M-15, OXA-1                                    | FIB, Frep, K                      | 1: 120   | <i>pemKI, ccdAB, vagCD, srnBC, pndAC</i>   |

|                              |              |    |      |     |   |   |  |  |   |
|------------------------------|--------------|----|------|-----|---|---|--|--|---|
|                              | C7230        | B2 | 131  | 131 | <i>tet(A)</i>   | CTX-M-15  | FIA, <u>FIB</u> , Frep, K                                | 1: <u>155</u>  | <i>pemKI</i> , <i>ccdAB</i> , <i>vagCD</i> , <i>srnBC</i> , <i>pndAC</i>                    |
|                              | C7227        | D  | 2873 | 648 | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   | CTX-M-14a, TEM-1b   | FIB, Frep  | 2: 180, 8  | <i>pemKI</i> , <i>ccdAB</i> , <i>hok-sok</i> , <i>srnBC</i>                                 |
|                              | C7231        | D  | 5080 | -   | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   | CTX-M-14a, TEM-1b   | FIB, Frep  | 2: 150, 90   | <i>pemKI</i> , <i>ccdAB</i> , <i>hok-sok</i> , <i>srnBC</i>                                 |
|                              | C7234        | D  | 5080 | -   | <i>tet(A)</i> , <i>aac(3')-II</i>   | CTX-M-14a, TEM-1b   | FIB, Frep  | 2: 150, 90   | <i>pemKI</i> , <i>ccdAB</i> , <i>hok-sok</i> , <i>srnBC</i>                                 |
|                              | C7235        | D  | 5081 | -   | -   | CTX-M-14b, TEM-1b   | FIB, Frep, K   | 4: 160, 120, 100, 35   | <i>srnBC</i>  |
|                              | C7236        | D  | 5081 | -   | -   | CTX-M-14b, TEM-1b   | FIB, Frep, K   | 4: 160, 120, 100, 35   | <i>srnBC</i>  |
|                              | C7224        | A  | 5079 | -   | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac(3')-II</i>                          | CTX-M-15, OXA-1   | <u>FIB</u> , Frep, K                                     | 1: <u>150</u>  | <i>pemKI</i> , <i>ccdAB</i> , <i>vagCD</i> , <i>srnBC</i>                                   |
|                              | <b>C7239</b> | A  | 5060 | -   | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB19</i> , <i>tet(B)</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> | <b><u>CTX-M-15<sup>a</sup></u></b> , <b><u>OXA-1</u></b>          | <b><u>FIA<sup>a</sup></u></b> , <b><u>FIB</u></b> , Frep | 1: <b><u>140</u></b>   | <b><u>pemKI</u></b> , <i>ccdAB</i> , <i>vagCD</i> , <b><u>srnBC</u></b>                     |
| <b>Pacientes pediátricos</b> | C4425        | D  | 69   | 69  | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(A)</i>   | CTX-M-15, OXA-1   | FIA  | 1: 150   | <i>vagCD</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i> , <i>pemKI</i> , <i>srnBC</i>                    |
|                              | <b>C4426</b> | D  |      |     | <b><i>aac(6')-Ib-cr</i>, <i>aac(3)-II</i>, <i>tet(A)</i></b>                                      | <b><u>CTX-M-15<sup>a</sup></u></b> , <b><u>OXA-1</u></b>          | <b><u>FIA</u></b> , <b><u>FIB<sup>a</sup></u></b>        | 3: 120, 130, <b><u>135<sup>a</sup></u></b>                   | <b><i>vagCD</i>, <i>relBE</i>, <i>ccdAB</i>, <i>pemKI</i>, <i>srnBC</i></b>                 |
|                              | <b>C4427</b> | D  |      |     | <b><i>aac(6')-Ib-cr</i>, <i>aac(3)-II</i>, <i>tet(A)</i></b>                                      | <b><u>CTX-M-15<sup>a</sup></u></b> , <b><u>OXA-1</u></b>          | <b><u>FIB<sup>a</sup></u></b>                            | 1: <b><u>135<sup>a</sup></u></b>                             | <b><i>vagCD</i>, <i>relBE</i>, <i>ccdAB</i>, <i>pemKI</i>, <i>srnBC</i></b>                 |
|                              | C4428        | A  | 44   | 10  | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(B)</i>   | CTX-M-15, OXA-1   | FIA, <u>FIB</u>  | 1: <u>140</u>  | <i>vagCD</i> , <i>ccdAB</i> , <i>pemKI</i> , <i>srnBC</i>                                   |
|                              | C4429        | A  |      |     | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(B)</i>   | <u>CTX-M-15<sup>a</sup></u> , OXA-1                               | <u>FIB<sup>a</sup></u>                                   | 5: 15, 85, 170, 175, <u>190<sup>a</sup></u>                  | <i>vagCD</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i> , <i>pemKI</i> , <i>srnBC</i>                    |
|                              | C4430        | A  | 656  | 10  | <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(B)</i>  | OXA-1, TEM-1b, SHV2a  | <u>FIB</u>   | 7: 20, 130, 165, <u>200</u> , 235, 280, 300                  | <i>hok-sok</i> , <i>vagCD</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i>                                 |
|                              | <b>C4431</b> | A  |      |     | <i>tet(B)</i>   | OXA-1, <b><u>TEM-1b</u></b> , <b><u>SHV2a</u></b>                 | FIA, <b><u>FIB</u></b>                                   | 9: 20, <b><u>140</u></b> , 175, 210, 245, 280, 315, 345, 385 | <b><i>hok-sok</i>, <i>vagCD</i>, <i>relBE</i>, <i>ccdAB</i></b>                             |
|                              | C4432        | C  | 90   | 23  | <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i>  | <u>CTX-M-15<sup>d</sup></u> , OXA-1                               | I1, FIA, <u>FIB<sup>a</sup></u> , N                      | 5: 30, 40, <u>140<sup>d</sup></u> , 160, 250                 | <i>pndAC</i> , <i>vagCD</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i> , <i>pemKI</i> , <i>srnBC</i>     |
|                              | <b>C4433</b> | A  | 167  | 10  | <b><i>aac(6')-Ib-cr</i>, <i>aac(3)-II</i>, <i>tet(A)</i>, <i>tet(B)</i></b>                       | <b><u>CTX-M-15<sup>a</sup></u></b> , <b><u>OXA-1</u></b>          | <b><u>FIB<sup>a</sup></u></b> , N                        | 2: 110, <b><u>190<sup>a</sup></u></b>                        | <b><i>hok-sok</i>, <i>vagCD</i>, <i>relBE</i>, <i>ccdAB</i>, <i>pemKI</i>, <i>srnBC</i></b> |
|                              | C4435        | B2 | 131  | 131 | <i>tet(A)</i>   | CTX-M-15 <sup>a</sup> , OXA-1                                     | <u>FIB<sup>a</sup></u>                                   | 1: <u>130<sup>a</sup></u>                                    | <i>hok-sok</i> , <i>pndAC</i> , <i>vagCD</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i> , <i>pemKI</i>   |
|                              | <b>C4436</b> | B1 | 58   | 155 | <b><i>aac(6')-Ib-cr</i>, <i>aac(3)-II</i></b>   | <b><u>CTX-M-15<sup>a</sup></u></b> , <b><u>OXA-1</u></b> , TEM-1b | <b><u>FIB<sup>a</sup></u></b> , I1                       | 2: <b><u>140<sup>a</sup></u></b> , <b><u>350</u></b>         | <i>pndAC</i> , <i>relBE</i> , <i>ccdAB</i> , <i>srnBC</i>                                   |

Las cepas conjugativas,  $\beta$ -lactamasas y determinantes plasmídicos transferidos por conjugación están marcados en negritas.

Las  $\beta$ -lactamasas y plásmidos asociados detectados por hibridación están subrayados.

<sup>a</sup>: Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y el tipo de plásmido donde fue localizado por hibridación.

<sup>b</sup>: Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> y el tipo de plásmido donde fue localizado por hibridación. ND: no determinado.

## CONCLUSIONES

1. Los perros sanos son potenciales reservorios de cepas de *E. coli* multidrogo resistentes productoras de BLEEs, pAmpC y elementos genéticos movilizables.
2. Este es el primer reporte en México, de la presencia de genes codificantes para BLEE, pAmpC, RQMP, y de la descripción de plásmidos e integrones, en cepas de *E. coli* recuperadas de perros y tortugas sanas.
3. Los perros y las tortugas pueden participar en la diseminación de *E. coli* multirresistentes hacia otros ambientes y hospederos mediante el contacto directo.
4. La BLEE CTX-M-15 está ampliamente diseminada entre cepas de *E. coli* aisladas de todos los hospederos estudiados.
5. La cefamicinasa CMY-2 se detectó exclusivamente en cepas de *E. coli* aisladas de perros y tortugas.
6. El gen que codifica para la enzima CMY-2 fue localizado tanto en plásmidos de reducido (IncFIB), como de amplio rango de hospedero (IncI1), lo que sugiere una amplia ventaja evolutiva para la propagación plasmídica de esta enzima.
7. Integrones clásicos de clase 1 y 2 fueron identificados en todos los grupos de cepas, reflejando la amplia distribución y diseminación de estos elementos genéticos movilizables en los diferentes hospederos.
8. Los plásmidos del grupo IncF son los más prevalentes en las cepas estudiadas, sugiriendo una estrecha asociación entre este tipo de plásmidos y la transferencia de genes de resistencia, específicamente con *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.
9. No se detectaron genes de virulencia clásicos de patotipos intestinales en las cepas de *E. coli* caracterizadas. Sin embargo, la presencia de factores de virulencia extra intestinales no debe ser descartada.
10. En este trabajo, se puso de manifiesto la diversidad clonal de cepas de *E. coli* productoras de BLEEs entre humanos sanos por primera vez en México.
11. Cepas de *E. coli* del complejo clonal ST131 y la subclona ST131-B2-O25:H4-H30-Rx, fueron detectadas por primera vez a partir de portadores humanos en México y Latino América.

12. La cepa C4435-ST131 de origen clínico presentó la variante *fimH35*, misma que no se relaciona con la alta tasa de resistencia a fluoroquinolonas y que respalda los reportes de una baja frecuencia y patogenicidad de esta clona en el ambiente hospitalario.
13. Existe una gran diversidad clonal de las cepas de *E. coli* multidrogorresistentes entre los hospederos estudiados, reflejando la amplia distribución de esta bacteria en el ambiente comunitario y nosocomial.
14. El filogrupo B2 sólo fue detectado en aislados provenientes de humanos (portadores y muestras clínicas), sugiriendo una adaptación específica a este hospedero.
15. Estos hallazgos pueden ayudar al desarrollo de estrategias para contener y reducir la resistencia antimicrobiana mediada por enzimas en un futuro cercano.

## **PERSPECTIVAS**

1. La transferencia de cepas multirresistentes entre animales de compañía y humanos es un fenómeno documentado, por lo que deben evaluarse los factores involucrados en la transmisión bidireccional de cepas de *E. coli* multidrogo resistentes entre estos hospederos.
2. Estudiar la localización del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> en otros replicones no evaluados en las *E. coli* CMY-2 positivas aisladas de perros.
3. Estudiar localización plasmídica y/o cromosómica de otros determinantes de resistencia, asociados a la baja susceptibilidad hacia quinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas en todas las cepas de *E. coli* evaluadas en este trabajo.
4. Determinar la presencia de algunas secuencias de inserción como IS26 e *ISEcp1*, que se han visto asociadas a la sobre expresión y propagación de algunos genes de resistencia.
5. Determinar la presencia de factores de virulencia asociados a patotipos extra intestinales en todas las cepas, así como la presencia de genes de virulencia asociados a los virotipos A, B, C, D o E en las cepas de *E. coli* ST131.
6. Secuenciar alguno de los plásmidos detectados en las cepas C7223 (de portadores) y C4435 (origen clínico) que pertenecen al complejo clonal ST131.
7. Realizar ensayos de invasión y adherencia de las cepas *E. coli* ST131 en una línea celular, a fin de evaluar su capacidad de colonización.
8. Monitorear la diseminación de la clona ST131 y la subclona ST131-B2-O25:H4-H30-Rx en el ambiente comunitario y nosocomial, así como extender su rastreo hacia otras zonas del país.
9. Futuros estudios se deberán enfocar a evaluar los factores asociados a la transmisión de cepas de *E. coli* multidrogo resistentes en el ambiente doméstico, clínico y veterinario.

## REFERENCIAS

- Al-Bahry SN, Al-Zadjali MA, Mahmoud IY, Elshafie AE. 2012. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere*; 87:1308-1315.
- Albrechtova K, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, Bebora L, Literak I. 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:4013-7.
- Albrechtova K, Kubelova M, Mazancova J, Dolejska M, Literak I, Cizek A. 2014. High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola. *Microb Drug Resist*; 20:372-5.
- Alcántar-Curiel MD, Alpuche-Aranda CM, Varona-Bobadilla HJ, Gayosso-Vázquez C, Jarillo-Quijada MD, Frías-Mendivil M, et al. 2015. Risk factors for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Escherichia coli* urinary tract infections in a tertiary hospital. *Salud Pública Mex*; 57:412-8.
- Alouache S, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, et al. 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist*; 20:30-38.
- Banerjee R, Johnson JR. 2014. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother*; 58:4997-5004.
- Batchelor M, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Paiba GA, Davies RH, Liebana E. 2005. Detection of multiple cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from a cattle fecal sample in Great Britain. *Microb Drug Resist*; 11:58-61.
- Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Canica MM, Vedel G, Névot P, Krishnamoorthy R, Paul G. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol Lett*; 120:75-80.
- Belas ., Salazar AS, Gama L., Couto N, Pomba C. 2014. Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs. *Vet Rec*; 175:202.
- Benner KW, Prabhakaran P, Lowros AS. 2014. Epidemiology of infections due to extended-



- spectrum Beta-lactamase-producing bacteria in a pediatric intensive care unit. *J Pediatr Pharmacol Ther*; 19:83-90.
- Ben Said L, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, et al. 2015. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* ; 203:86-92.
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N., Boudabous A, Torres C. 2012a. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis*; 9:1137-42.
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, et al. 2012b. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31:1511-6.
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B, Porres-Osante N, Jouni A, Klibi N, Boudabous A, et al. 2014. IncII Plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist*; 20:495-500.
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Cheikhna EO, Mohamed AM, Chairat S, et al. 2015. Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. *J Chemother*; 27:114-6.
- Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al. 2016. Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio*; 7:e00347-16.
- Bertrand S, Weill FX, Cloeckaert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, et al. 2006. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J Clin Microbiol*; 44:2897-903.
- Blanco M, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Dahbi G, Mora A, Blanco JE, et al. 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum b-lactamases

- in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*; 63:1135-41.
- Bortolaia V, Hansen KH, Nielsen CA, Fritsche TR, Guardabassi L. 2014. High diversity of plasmids harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *J Antimicrob Chemother*; 69:1492-6.
- Brenner DJ, Krieg NR, and Staley, J.T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part A Introductory Assays*, Springer, New York, NY, USA. 304 pp.
- Briñas L, Moreno MA, Teshager T, Zarazaga M, Sáenz Y, Porrero C, et al. 2003. Beta-lactamase characterization in *Escherichia coli* isolates with diminished susceptibility or resistance to extended-spectrum cephalosporins recovered from sick animals in Spain. *Microb Drug Resist*; 9:201-9.
- Briñas L, Lantero M, de Diego I, Alvarez M, Zarazaga M, Torres C. 2005. Mechanisms of resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* isolates recovered in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother*; 56:1107-10.
- Bryce A, Hay AD, Lane IF, Thornton HV, Wootton M, Costelloe C. 2016. Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*; 352:i939.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:969-976.
- Canton R, Coque TM. 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*; 9:466-475.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*; 14 Suppl 1:144-53.
- Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*; 18:413-31.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005a. Identification of

- plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*; 63:219-228.
- Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di Matteo P, Battisti A. 2005b. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:833-5.
- Carattoli A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 53:2227-38.
- Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*; 303:298-304.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*; 58:3895-903.
- Carlos C, Pires, MM, Stoppe, NC, Hachich EM, et al. 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol*; 10:161.
- Caroff N, Espaze E, Gautreau D, Richet H, Reynaud A. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing *ampC*. *J Antimicrob Chemother*; 45:783-8.
- Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*; 52:3801-4.
- Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, et al. 2014. First detection of CMY-2 plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. *Rev Argent Microbiol*; 46:30-33.
- Chen CY, Chen WC, Chin SC, Lai YH, et al. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolates from reptiles in Taiwan. *J Vet Diagn Invest*; 22:44-50.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*; 66:4555-8.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep*; 5(1):58-65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI document M100-S21, Vol. 31, no 1.

- Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*; 46:500-10.
- Coque TM, Baquero F, Canton R. 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill*; 13.pii:19044.
- Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, et al. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol*; 76:2799-805.
- Costa D, Poeta P, Briñas L, Sáenz Y, Rodrigues J, Torres C. 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Antimicrob Chemother*; 54:960-1.
- Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*; 8:26-38.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. 2013. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*; 303:305-317.
- Dahmen S, Haenni M, Châtre P, Madec JY. 2013. Characterization of *bla*<sub>CTX-M</sub> IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *J Antimicrob Chemother*; 68:2797-801.
- den Reijer PM, van Burgh S, Burggraaf A, Ossewaarde JM, van der Zee A. 2016. The widespread presence of a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 clade among community-associated and hospitalized patients. *PLoS ONE*; 11:1-13.
- Díaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A, Siebeling RJ. 2006. Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana. *Appl Environ Microbiol*; 72:306-312.
- Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, et al. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother*; 67:1368-1374.
- Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, et al. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing

- Escherichia coli* among companion animals. J Antimicrob Chemother; 65:651-60.
- Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A Junior, et al. 2014. Detection of chromosomal *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. Clin Microbiol Infect; doi: 10.1111/1469-0691.12531.
- Foti M, Giacobello C, Bottari T, Fisichella V, Rinaldo D, Mammina C. 2009. Antibiotic resistance of gram negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. Mar Pollut Bull; 58:1363-1366.
- García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. 2009. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. J Antimicrob Chemother; 63:274-81.
- García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, et al. 2011. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. J Antimicrob Chemother; 66:1725-1729.
- Garza-González E, Mendoza Ibarra SI, Llaca-Díaz JM, Gonzalez GM. 2011. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. J Med Microbiol; 60:84-90.
- Gautom RK. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol; 35:2977-80.
- Gómez-Duarte OG, Arzuza O, Urbina D, Bai J, Guerra J, Montes O, et al. 2010. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. Foodborne Pathog Dis; 7:199-206.
- Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Zarazaga M. 2013. High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact?. Comp Immunol Microbiol Infect Dis; 36:83-94.

- Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard JM, Olsen JE, Dalsgaard A. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*; 49:929-36.
- Guo YF, Zhang WH, Ren SQ, Yang L, Lü DH, Zeng ZL. 2014. IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One*; 9: 1-7.
- Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E; Latin America Working Group on Bacterial Resistance. 2014. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis*; 18:421-33.
- Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, et al. 2014. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*; 69:2650-7.
- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:3332-3337.
- Harada K, Nakai Y, Kataoka Y. 2012. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiol Immunol*; 56:480-5.
- Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, Porczak A, Granholm S, et al. 2013. Characterization and comparison of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS One*; 8:1-9.
- Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. 2006. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 50:3203-6.
- Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, et al. 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol*; 4:242.

- Huber H, Zweifel C, Wittenbrink MM, Stephan R. 2013. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Vet Microbiol*; 162:992-6.
- Jacoby, G.A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*; 22:161-82.
- Kang SG, Lee DY, Shin SJ, Ahn JM, Yoo HS. 2005. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *Vet Sci*; 6:201-5.
- Karczmarczyk M, Walsh C, Slowey R, Leonard N, Fanning S. 2011. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Appl Environ Microbiol*; 77:7121-7.
- Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 53:3582-4.
- Lee B, Kang SY, Kang HM, Yang NR, Kang HG, Ha IS, et al. 2013. Outcome of Antimicrobial Therapy of Pediatric Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Infect Chemother*; 45:415-21.
- Lévesque C, Roy PH. 1993. PCR analysis of integrons, pp. 590-594. In Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White T.J. *Diagnostic Molecular Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- Liu D, Wilson C, Hearlson J, Singleton J, Thomas RB, Crupper SS. 2013. Prevalence of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria associated with the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *J Zoo Wildl Med*; 44:666-671.
- Logan LK, Meltzer LA, McAuley JB, Hayden MK, Beck T, Braykov NP, et al. 2014. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Infections in Children: A Two-Center Case-Case-Control Study of Risk Factors and Outcomes in Chicago, Illinois. *J Pediatric Infect Dis Soc*; 3:312-9.
- Mac Faddin, Jean F. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires; México, D.F. Médica Panamericana.
- Madsen L, Aarestrup FM, Olsen JE. 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Vet Microbiol*; 75:73-82.
- Martínez-Martínez L. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*; 14 Suppl 1:82-9.

- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*; 28:565-91.
- Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. 1998. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*; 32:1243-6.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* ; 44:1568-74.
- MLST Databases at UoW. Available at: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>. The University of Warwick.
- Mnif B, Vimont S, Boyd A, Bourit E, Picard B, Branger C, et al. 2010. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*; 65:1599-603.
- Molina-López J, Aparicio-Ozores G, Ribas-Aparicio RM, Gavilanes-Parra S, Chávez-Berrocal ME, Hernández-Castro R, et al. 2011. Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J Infect Dev Ctries*; 5:840-9.
- Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, et al. 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One*; 9:e87025.
- Moreno A, Bello H, Guggiana D, Domínguez M, González G. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Vet Microbiol*; 129:203-8.
- Murphy C, Reid-Smith RJ, Prescott JF, Bonnett BN, Poppe C, Boerlin P, et al. 2009. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *Can Vet J*; 50:1047-53.
- Navarro F, Mesa RJ, Miró E, Gómez L, Mirelis B, Coll P. 2007. Evidence for convergent evolution of CTX-M-14 ESBL in *Escherichia coli* and its prevalence. *FEMS Microbiol Lett*; 273:120-3.



- Navia MM, Ruiz J, Sanchez-Cespedes J, Vila J. 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 46:295-8.
- Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*; 27:543-74.
- Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*; 20:821-830.
- O'Keefe A, Hutton TA, Schifferli DM, Rankin SC. 2010. First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:3489-92.
- Okubo T, Sato T, Yokota S, Usui M, Tamura Y. 2014. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J Infect Chemother*; 20:243-9.
- Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, et al. 2014. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*; 58:6886-95.
- Ørskov F and Ørskov I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In *Methods in Microbiology*, vol. 14, pp. 43–112. Edited by T. Bergan. London: Academic Press.
- Oteo J, Cercenado E, Fernández-Romero S, Saéz D, Padilla B, Zamora E, et al. 2012. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* as a cause of pediatric infections: report of a neonatal intensive care unit outbreak due to a CTX-M-14-producing strain. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:54-8.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, et al. 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*; 51:2720-5
- Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng B, Oundo J, et al. 2012. Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin Infect Dis*; 55 Suppl 4:S294-302.

- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*; 50:3953-5.
- Paterson DL. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*; 34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
- Perreten V1, Boerlin P. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:1169-72.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*; 40:2153-62.
- Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:2188-95.
- Pitout J, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. 1998. beta-Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*; 42:1350-4.
- Pitout JD, Laupland KB. 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*; 8:159-166.
- Platell JL, Cobbold RN, Jhonson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, et al. 2011. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrob Agents Chemother*; 55:3782-7.
- Pomba C, da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martínez-Martínez L. 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother*; 53:327-8.
- Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. 2013. The epidemic of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio*; 4:e00377-13.
- Redondo C, Chalbaud A, Alonso G. 2013. Frequency and diversity of CTX-M enzymes among

- extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from Caracas, Venezuela. *Microb Drug Resist*; 19:42-47.
- Reyna-Flores F, Barrios H, Garza-Ramos U, Sánchez-Pérez A, Rojas-Moreno T, Uribe-Salas FJ, et al. 2013. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O25b-ST131 isolates causing community-acquired UTIs in Mexico. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 76:396-8.
- Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain P, Somalo S, Palácios-Hernández JM, et al. 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother*; 65:169-71.
- Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, et al. 2012. *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother*; 67:886-97.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:3996-4001.
- Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, Martínez S, Rojo-Bezares B, et al. 2010. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol*; 144:493-497.
- Sallem R B, Gharsa H, Slama KB, Rojo-Bezares B, Estepa V, Porres-Osante N, et al. 2013. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 13:98-102.
- Sallem RB, Slama KB, Estepa V, Cheikhna EO, Mohamed AM, Chairat S, et al. 2015. Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. *J Chemother*; 27:114-6.
- Sanchez S, McCrackin Stevenson MA, Hudson CR, Maier M, Buffington T, Dam, Q, et al. 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *J Clin Microbiol*; 40:3586-95.
- Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, Endimiani A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-

- resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?. *Drug Resist Updat*; 16:22-45.
- Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:6003-6005.
- Shaheen BW, Nayak R, Foley SL, Kweon O, Deck J, Park M, et al. 2011. Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*; 55:5666-75.
- Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A; Bacterial Resistance Consortium, et al. 2013. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*; 8:1-10.
- Sørensen AH, Hansen LH, Johannesen E, Sørensen SJ. 2003. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:798-9.
- Stapleton PD, Shannon KP, French GL. 1999. Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid-determined CMY-4 beta-lactamase production and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*; 43:1206-10.
- Sun Y, Zeng Z, Chen S, Ma J, He L, Liu Y, et al. 2010. High prevalence of *bla*<sub>(CTX-M)</sub> extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin Microbiol Infect*; 16:1475-81.
- Tamang MD, Nam HM, Jang GC, Kim SR, Chae MH, Jung SC, et al. 2012. Molecular characterization of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*; 56:2705-12.
- Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW. 2005. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*; 43:5860-4.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*; 33:2233-9.
- Teshager T, Domínguez L, Moreno MA, Saénz Y, Torres C, Cardeñosa S. 2000. Isolation of an

- SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother*; 44:3483-4.
- Trott, D. 2013.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. *Curr Pharm Des*; 19:239-49.
- van de Klundert JA, Vliegthart JS. 1993. Nomenclature of aminoglycoside resistance genes: a comment. *Antimicrob Agents Chemother*; 37:927-8.
- Vinué L, Lantero M, Sáenz Y, Somalo S, de Diego I, Pérez F, et al. 2008. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *J Med Microbiol*; 57:916-20.
- Vinué L, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, et al. 2009. Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect*; 15:954-7.
- Wagner S, Gally DL, Argyle SA. 2014. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and *ampC*-replicons. *Vet Microbiol*; 169:171-8.
- Wedley AL, Maddox TW, Westgarth C, Coyne KP, Pinchbeck GL, Williams NJ, et al. 2011. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Vet Rec*; 168:354.
- Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al. 2012. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*; 78:1353-60.
- White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. 2001. Integrons and gene cassettes in the *enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 45:2658-61.
- Whitten T, Bender JB, Smith K, Leano F, Scheftel J. 2015. Reptile-associated salmonellosis in Minnesota, 1996-2011. *Zoonoses Public Health*; 62:199-208.
- Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *Int J Med Microbiol*; 301:635-41.
- Wiesner M, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Zavala-Alvarado C, Zaidi MB, Calva E, et al.

2013. Conjugative transfer of an IncA/C plasmid-borne *bla<sub>CMY-2</sub>* gene through genetic re-arrangements with an IncX1 plasmid. *BMC Microbiol*; 13:1-17.
- Winokur PL, Vonstein, DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV. 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 2716-2722.
- Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F., Mensa P, Wieler LH, et al. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol*; 60:1136-51.
- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*; 35:736-55.
- Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. 2007. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*; 51:3354-60.
- Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, Chim R, Arjona F, Leon M, et al. 2013. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol*; 4:1-10.
- Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. 2015. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from healthy rural residents of Taiwan, China. *Front Microbiol*; 6:239.
- Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, Liu Y, Tian W, et al. 2010. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother*; 54:4219-4224.

# ANEXOS

## ANEXO 1

## CUESTIONARIO APLICADO A LOS DUEÑOS DE LOS PERROS MUESTREADOS.

|  |  |
|--|--|
| <b>Lugar (colonia y calle) y fecha:</b>  |  |
| <b>Nombre del dueño:</b>   |  |
| <b>Nombre de la mascota (opcional):</b>  |  |
| <b>Edad: _____ años</b>  | <b>Sexo:          Hembra____ Macho____</b> |
| <b>¿Qué tiempo tiene con su mascota?    Años____ Meses____</b>                                       |  |
| <b>¿Su mascota padece alguna enfermedad?</b><br>SI ____          NO____                              |  |
| <b>En caso de haber respondido SI, ¿Qué enfermedad padece?</b>                                       |  |
| <b>¿Actualmente le administra algún antibiótico?</b><br>SI ____          NO ____          Cuál _____ |  |
| <b>¿Hace cuánto tiempo que tomó antibiótico?</b>   |  |
| <b>¿Qué antibiótico usó?</b>   |  |
| <b>¿Para qué infección lo usó?</b>   |  |
| <b>Firma del dueño, con la cual manifiesta aceptar los requerimientos del estudio:</b><br><br>_____  |  |



**CUESTIONARIO APLICADO A LOS VOLUNTARIOS SANOS PREVIO A LA  
TOMA DE MUESTRA.**

|  |   |
|--|---|
| <b>Lugar y fecha:</b>  |   |
| <b>Nombre del voluntario:</b>  |   |
| <b>Nombre del tutor (en caso de que el voluntario sea menor de 18 años):</b>                                       |   |
| <b>Edad:</b> _____ años  | <b>Género:</b> <b>Mujer</b> ____ <b>Hombre</b> ____ |
| <b>Lugar donde labora o estudia:</b>   |   |
| <b>¿Padece alguna enfermedad crónica?</b><br>SI ___      NO ___  |   |
| <b>En caso de haber respondido SI, ¿Qué enfermedad padece?</b>   |   |
| <b>¿Toma algún medicamento de base?</b><br>SI ___      NO ___  |   |
| <b>¿Actualmente toma algún antibiótico?</b><br>SI ___      NO ___ <b>Cuál</b> _____                                |   |
| <b>¿Hace cuánto tiempo que no toma antibiótico?</b>  |   |
| <b>¿Qué antibiótico tomó?</b>  |   |
| <b>¿Para qué infección lo tomó?</b>  |   |
| <b>En caso de participar con alguna persona que vive en su hogar, ¿Cuál es el parentesco que guardan?</b>          |   |
| <b>Firma del voluntario (o tutor), con la cual manifiesta aceptar los requerimientos del estudio:</b><br><br>_____ |   |

## ANEXO 2

### METODOLOGÍAS

#### 5.1 Templado

**5.1.1 Técnica de hervido.** Con esta técnica se provocó la ruptura celular mediante ebullición, lo que ocasionó la liberación del ADN bacteriano (templado).

A partir de un cultivo puro de 24 h de crecimiento se realizó la siguiente metodología:

1. El cultivo bacteriano se resuspendió en 500 µl de agua (inyectable Pisa®).
2. Se sometió a ebullición durante 10 min en baño María. Se dejó enfriar durante 5 min.
3. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min.
4. El sobrenadante se recuperó y se midió la concentración de ADN/proteínas.

**5.1.2 Wizard Genomic DNA Purification Kit.** Para algunas PCR se utilizó ADN obtenido con este kit comercial mediante los siguientes pasos:

***Sedimentación celular:***

1. Se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano incubado overnight en caldo Luria Bertani (LB), a 13,000 rpm durante 2 min.

***Lisis celular:***

2. Se agregaron 600 µl de la solución de *lisis nuclei* y se mezcló con pipeta.
3. Se incubó por 5 min a 80°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se agregaron 300 µl de RNAsa y se incubó a 37 por 30 °C min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

***Precipitación de proteínas:***

5. Se agregaron 200 µl de la solución de precipitación y se agitó en vortex durante 20 seg.
6. Se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 13,000 durante 3 min.

***Precipitación y rehidratación del ADN:***

7. El sobrenadante se separó y se transfirió a un tubo con 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión.
8. Se centrifugó a 13,000 durante 2 min y el sobrenadante se desechó. El exceso se absorbió con papel.

9. Se agregaron 600 µl etanol al 70% y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13,000 durante 2 min.
10. El etanol se aspiró y se dejó secar la pastilla durante 15 min.
11. La pastilla se rehidrató en 100 µl de *solución de rehidratación* y se incubó a 65 °C durante 1 h mezclando continuamente.
12. La concentración de ADN se midió a 260 nm y se almacenó a 4 °C.

## 5.2 ADN plasmídico

**5.2.1 QIAprep® Spin Miniprep kit.** Con este kit comercial se realizó la extracción del ADN que se utilizó en la caracterización de replicones plasmídicos, llevando a cabo los siguientes pasos:

1. 5 ml de cultivo bacteriano se centrifugaron (previamente sembrado en LB e incubado overnight) a 13,000 rpm durante 3 min.
2. Se resuspendió en 250 µl de *Buffer P1* y se transfirió a un tubo nuevo.
3. Se agregaron 250 µl de *Buffer P2* y se mezcló por inversión hasta que la solución se tornó clara. No se dejó que la reacción transcurriera por más de 5 min.
4. Se adicionaron 350 µl de *Buffer N3* y se mezcló por inversión 6 veces.
5. Se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se recuperó y se transfirió por decantación a una *columna QIAprep*.
6. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se descartó. La columna se lavó adicionando 750 µl de *Buffer PE* y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min. Se repitió el centrifugado para remover el Buffer de lavado residual.
7. La *columna QIAprep* se colocó en un tubo nuevo y se agregaron 50 µl de agua para eluir el ADN. Se dejó reposar durante 1 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min.
8. El ADN se cuantificó a 260 nm y se almacenó a 4 °C.

## 7.4 Purificación de los productos de PCR

Algunos productos de PCR fueron purificados previamente a su secuenciación, con ayuda del kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit”. Ver anexo 2.

1. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1%, se tiñó y la banda de interés se cortó con ayuda del transiluminador (Benchtop UV, UVP).

2. Se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente pesado, se volvió a pesar y el peso del gel se determinó por diferencia.
3. Se adicionó *ADB Buffer* en 3 veces el peso del gel (ejemplo: si el peso fue 0.15g, se adicionaron 450  $\mu$ l).
4. Se incubó a 55°C durante 10 min (o hasta que la agarosa se disolviera), mezclando por inversión cada 2 min.
5. Se transfirió a un filtro con tubo colector y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min. El líquido del tubo colector se desechó.
6. Se lavó 2 veces con 200  $\mu$ l de *DNA Wash Buffer* y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 seg entre cada lavado.
7. El filtro se transfirió a un tubo nuevo y el ADN se eluyó en 20  $\mu$ l de agua centrifugando a 13,000 rpm durante 1 min.
8. Se midió la concentración de ADN en el NanoDrop y 1  $\mu$ l del purificado se corrió en un gel de agarosa al 1% para visualizar el producto.
9. El producto se resguardó a 4°C hasta su envío.

## 8.2 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Esta técnica se utilizó para determinar la relación poblacional de las cepas en base a un patrón de restricción generado por la endonucleasa *XbaI*.

Se siguió el protocolo propuesto por Gautom y colaboradores (Gautom *et al.*, 1997), brevemente modificado (Ruiz *et al.*, 2012), como se indica a continuación:

### ***Preparación de los insertos:***

A partir de un cultivo puro crecido durante 24 h en agar BHI, se realizó una suspensión en 1 ml de *Buffer SE* (75mM NaCl y 25mM EDTA, pH 8) hasta conseguir una absorbancia de 1.35-1.5 a 610 nm. Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón *TE* (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54°C. Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes (insertos). Se dejó solidificar unos minutos en refrigeración. Preparación de soluciones ver anexo 3.

***Lisis bacteriana:***

Se emplearon 3 insertos por cepa, a los que se añadieron 3 ml de *Buffer de lisis* [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 24 h en baño María a 54°C.

***Lavado de los insertos:***

Tras eliminar el *Buffer de lisis*, se realizaron los siguientes lavados en baño María a 54°C, agregando:

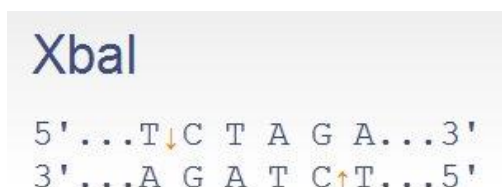
- 3 ml de agua destilada estéril cada 10 min, tres veces.
- 3 ml de *Buffer TE* cada 10 min, dos veces.
- 3 ml de *Buffer TE* a temperatura ambiente, una vez.

Los insertos se conservaron en 3 ml de *Buffer TE* a 4°C hasta su utilización.

***Digestión enzimática:***

Se digirió medio inserto de cada cepa con la enzima *XbaI* (Thermo Fisher Scientific®), generando fragmentos de acuerdo a los sitios de corte específicos (Figura 23). El volumen final del tampón de digestión fue de 100 µl por tubo, a los que se les añadió 40 U de enzima *XbaI* (New England, Biolabs), 10 µl de Buffer 10X de la enzima y agua miliQ estéril. La mezcla y el inserto se incubaron durante 6 h a 37°C.

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| <b>Reacción:</b> | Enzima <i>XbaI</i> : 2 µl |
|                  | Buffer 10X: 10 µl         |
|                  | Agua: <u>88 µl</u>        |
|                  | Vol. Final: 100 µl        |



**Figura 23.** Sitios de corte de la enzima *XbaI* (<https://www.thermofisher.com>).

La reacción se detuvo poniendo los insertos en tubos con 150  $\mu$ l de EDTA 0.5M/1% de sarcosil (N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) e incubando en hielo durante 10 min. El exceso de sarcosil se eliminó con papel absorbente antes de cargar el inserto en el gel de corrimiento.

***Preparación del gel de agarosa:***

Se preparó un gel de agarosa (agarose D-5, Pronadisa, Conda) al 1.2% disuelta en TBE 0.5X. Los pozos se rellenaron con los insertos, cargando en el primer y último pozo el marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker de New England, BioLabs); finalmente, los pozos se sellaron con agarosa a 50°C.

***Electroforesis:***

La electroforesis se realizó en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 $\mu$ M (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 23 h a 14 °C.

***Tinción del gel y visualización:***

El gel se tiñó durante 10 min en una solución acuosa de 200 ml de BET [10  $\mu$ l del stock/ 200 ml] y se visualizó y digitalizó en el captador de imágenes ChemiGenius (GenSnap from SynGene). El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose periódicamente hasta una correcta visualización.

## **10. Transferencia genética**

### **10.1 Conjugación**

Con la finalidad de evaluar la transferencia horizontal de determinantes de resistencia en cepas seleccionadas (elegidas con base al perfil de patrones PFGE-*XbaI* y al contenido génico de resistencia), se llevaron a cabo ensayos de conjugación, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

1. Se partió de un cultivo puro de las cepas donadoras (cepas en estudio) y receptoras crecidas durante 24 h en placas de agar TSA. En los casos en que la cepa donadora era sensible a rifampicina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml, se utilizó como cepa receptora a *E. coli* C600 y/o *E. coli* J53, que son resistentes a rifampicina (RIF<sup>R</sup>); mientras que en aquellos en los que la donadora era RIF<sup>R</sup>, se utilizó como receptora a *E. coli* J53, resistente a azida de sodio (AZI<sup>R</sup>).

Cabe mencionar que *E. coli* C600 es lactosa negativa (lac-) por lo que al crecer en agar Mac Conkey se aprecian colonias de color café claro, mientras que *E. coli* J53 RIF<sup>R</sup> y *E. coli* J53 AZI<sup>R</sup> son lactosas positivas (lac+), dando lugar a típicas colonias rosas en el mismo medio.

2. Tanto las cepas donadoras como las receptoras se crecieron en 5 ml de caldo BHI durante 24 h a 37°C en agitación.
3. Se mezclaron 250 µl de la cepa donadora y 1 ml de la receptora en un matraz con 20 ml de caldo LB. Se incubó durante 24 h a 37 °C en agitación.
4. Se realizaron diluciones seriadas  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  en 1 ml de caldo LB y se plaquearon 100 µl de cada una en placas con agar Mac Conkey (BD Bioxon®) suplementadas con rifampicina o azida de sodio (100 µg/ml) en función de la cepa receptora utilizada, y combinadas con CTX a una concentración de 2.5 µg/ml. Se incubaron durante 24 h a 37 °C.
5. Se seleccionaron de 2 a 4 colonias, es decir, posibles transconjugantes por placa, (o en algunos casos 1 si crecía una sola colonia) y se sembraron en placas con agar Mac Conkey adicionado con CTX (2µg/ml), incubándolas a 37 °C durante 24 h. En los casos en que se utilizó como cepa receptora a *E. coli* C600 se eligieron colonias lac- como posibles transconjugantes.
6. Las posibles Tc se guardaron a -70°C en viales con caldo BHI/glicerol al 10% para estudios posteriores.

**Nota:** Se preparó una solución stock de cefotaxima y rifampicina por separado a una concentración de 20 mg/ml para de ahí hacer diluciones. La cefotaxima se solubilizó en agua y la rifampicina en metanol.

## 11.2 Determinación de número y tamaño de plásmidos

Se llevaron a cabo ensayos de digestión con ADN total mediante la técnica PFGE y el uso de la nucleasa S1, con la finalidad de conocer el número y tamaño de los plásmidos presentes en las cepas donadoras y sus Tc. Se siguió el protocolo descrito en la sección 8.2, modificando la enzima, las cantidades de digestión y el tiempo de corrimiento electroforético, como se indica a continuación:

***Digestión enzimática:***

Se digirió medio inserto de cada cepa 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 miliQ estéril. Se incubó por 40 min a temperatura ambiente.

|                  |             |                |
|------------------|-------------|----------------|
| <u>Reacción:</u> | Enzima S1:  | 1.6 µl         |
|                  | Buffer 5X:  | 20 µl          |
|                  | Agua:       | <u>78.4 µl</u> |
|                  | Vol. Final: | 100 µl         |

Transcurridos los 40 min de incubación, la digestión se detuvo colocando el inserto en un tubo con 150 µl de EDTA 0.5M y sarcosil ((N-Lauroylsarcosine sodium salt, Merck®) al 1% e incubando en hielo durante 10 min. Posteriormente los insertos se cargaron en el gel de agarosa al 1.2%, previamente secando con papel absorbente el exceso de sarcosil y colocando el marcador de peso molecular MidRange I PFG Marker (New England Biolabs) en el primer y último pozo del gel. *E. coli* NCTC 50192 se usó como cepa control, puesto que contiene 4 plásmidos de tamaño conocido: 154, 66, 48 y 7 kb (Philippon, *et al.*, 1997).

***Electroforesis:***

Se realizó en la cámara CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75µM (0.5g/L, Merck®). El gradiente de voltaje fue 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 seg durante 22 h. a 14 °C. El gel se tiñó y digitalizó.

**12.1 Ensayos de hibridación**

El proceso de hibridación se realizó utilizando un método radiactivo con <sup>32</sup>P, mismo que se describe a continuación:

***Síntesis y marcaje de las sondas:***

La síntesis de las sondas se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos y condiciones específicos para cada gen. Los genes amplificados y purificados fueron los siguientes:

**Genes de resistencia:** *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>

**Replicones:** IncI, IncFIA, IncFIB



El marcaje de las sondas se con  $^{32}\text{P}$  mediante un kit comercial (RadPrime DNA Labeling System, Thermo Fisher Scientific). La sonda junto con los componentes del kit se desnaturalizó a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se agregó  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  de la marca radioactiva y se renaturalizó en hielo por 2 min. Una vez marcada la sonda se conservó en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Las cepas *E. coli* C600 y *E. coli* J53 RIF<sup>R</sup> fueron usadas como control negativo, puesto que son cepas libres de plásmidos.

#### ***Transferencia por Southern blot:***

Se partió de un corrimiento electroforético con ADN plasmídico obtenido mediante la técnica PFGE-S1 (procedimiento descrito en la sección 11.2 de este anexo). El gel se tiñó con BET y se digitalizó junto con una regla para facilitar la lectura de las bandas al final de la técnica.

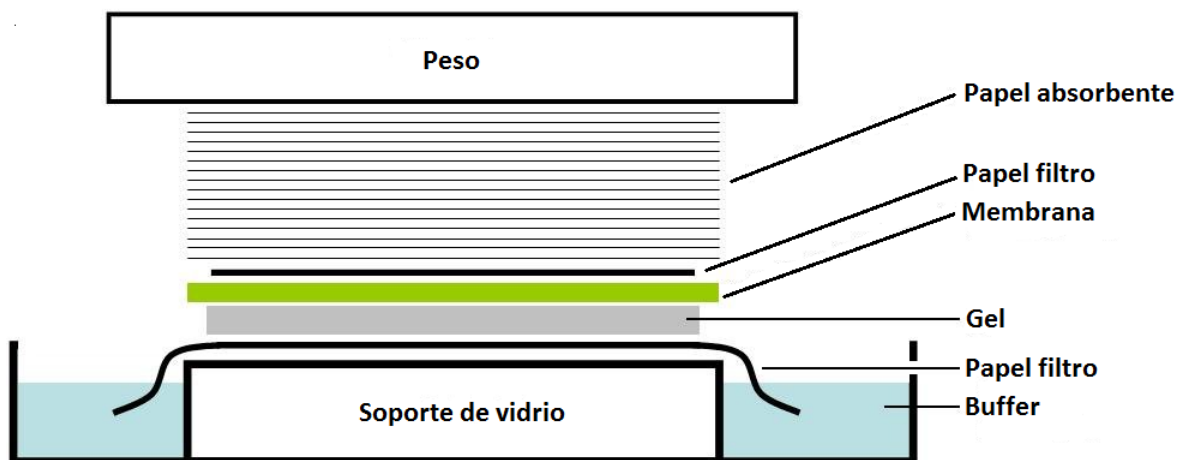
Posteriormente, el gel se trató con una solución desnaturalizante y una neutralizante, manteniéndolo en agitación con los siguientes lavados:

HCL 0.15N durante 15 min.

NaOH 0.5M-NaCl 1.5M durante 20 min, 2 veces.

Tris 0.5M-NaCl 1.5M durante 30 min, 2 veces.

Finalmente, se realizó un montaje para transferir el ADN a una membrana de nylon. Dicho montaje consistió en colocar 400 ml de NaOH 0.4M (buffer de transferencia) en un recipiente, sobre el que se colocó un soporte firme (vidrio) y un puente de papel filtro sumergido por ambos extremos en la solución de NaOH y aislado por las orillas con papel parafilm. El gel se situó sobre el papel filtro y encima de él se colocó la membrana de nylon (Hybond-N, GE Healthcare Lifescience), permitiendo así la transferencia. Inmediatamente sobre la membrana se colocó papel filtro y sobre éste varias capas de papel absorbente, seguido de otro soporte (vidrio); finalmente se colocó suficiente peso para facilitar la transferencia (Figura 24), misma que se llevó a cabo durante toda la noche o durante 12 horas.



**Figura 24.** Montaje de transferencia *Southern blot*.

Transcurrido el tiempo, la membrana de nylon se fijó con luz ultravioleta durante 5 min. Posteriormente se le realizaron 2 lavados con SSC 3X y SDS al 10% por 30 min cada uno, hasta que el pH de la membrana fuera de 7, mismo que se midió con tiras reactivas (papel indicador universal, CIVEQ®). En este paso la membrana se guardó en una bolsa hermética con agua destilada a 4°C para su posterior pre-hibridación.

#### ***Pre-hibridación:***

Este proceso se realizó utilizando dos soluciones de pre-hibridación. Ambas se utilizaron alternativamente.

#### **Solución 1:**

La solución de pre-hibridación se preparó mezclando los siguientes componentes y cantidades:

|                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Formamida (Invitrogen®)     | 2500 µl               |
| SSC 20X                     | 1250 µl               |
| Denhards 100X               | 250 µl                |
| EDTA 0.25M pH 8             | 20 µl                 |
| Tris 1M pH 7.5              | 50 µl                 |
| SDS 10%                     | 50 µl                 |
| Agua                        | 755 µl                |
| ADN de timo de ternera (TT) | <u>125 µl</u><br>5 ml |

**Nota:** El TT y el agua se colocan en baño María durante 5 min, después en hielo por 2 min y finalmente se agregan al resto de los componentes. En cada tubo de hibridación se ponían los 5 ml de solución. Ver preparación de soluciones en el anexo 3.

**Solución 2:**

|  | Para 100 ml |
|--|-------------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5M, pH= 7.2 | 6.9 g       |
| SDS 7%   | 7 g         |
| EDTA 1mM pH= 8                                 | 400 µl      |
| BSA 1%   | 1 g         |

**Nota:** Primero se preparó la solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, pH= 7.2 (Anexo 3), se mezcló con el EDTA 1mM pH= 8, se aforó a 100 ml y se esterilizó. Una vez estéril se le adicionaron lentamente los 7 g de SDS hasta disolver. La BSA se agregó al momento de usar la solución, precalentándola a 65 °C para disolverla. En cada tubo de hibridación se ponían 18 ml de solución de pre-hibridación, por lo que se pesaban 0.18 g de BSA.

La membrana se colocó en el tubo de hibridación y se agregó la solución de pre-hibridación, se dejó incubar por 4 h a 42 °C en el horno de hibridación si se ocupó la solución 1; y a 65 °C por 4 h si se ocupó la solución 2.

**Hibridación:**

Una vez transcurrido el tiempo de pre-hibridación, se agregó la sonda marcada (previamente descongelada) y se incubó en el horno de hibridación a 42 °C (para la solución 1) o a 65 °C (solución 2) durante 18 h.

Posteriormente se realizaron los siguientes lavados, dependiendo de la solución de pre-hibridación utilizada:

**Solución 1:**

1. SSC 2X con SDS al 10% por 10 min.
2. SSC 0.5X con SDS al 10% por 20 min.

**Solución 2:**

1. SSPE 5X con SDS al 0.2% por 10 min.
2. SSPE 2X con SDS al 0.1% por 10 min.
3. SSPE 0.4X con SDS al 0.05% por 10 min a 65 °C.

**Nota:** La mayoría de las veces el lavado 1 fue suficiente para retirar el exceso de marca, pero en caso de ser necesario, se procedió a realizar el lavado número 2.

Después de retirar la solución del último lavado, el nivel de marca se detectó con ayuda del Geiger (contador de los niveles de radiación); éste se pasó lentamente a lo largo de la membrana y cuando se escuchó diferencia en la intensidad del sonido, se procedió a cubrir la membrana con papel *Kleen pack* y a colocarla en el cassett de exposición.

**Nota:** después de la primera hibridación la sonda se conservó en congelación para posteriores hibridaciones.

***Exposición y revelado:***

En completa oscuridad, se colocó una película fotográfica (Kodak X-Omat LS film) por encima de la membrana, el cassette se cerró y se resguardó durante 48 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a realizar el revelado en completa oscuridad, colocando la película fotográfica en la *solución de revelado* (Carestream®) durante 1 min e inmediatamente después en la *solución fijadora* (Carestream®) durante el mismo tiempo. Ya con luz, la película se lavó con abundante agua y las bandas detectadas se compararon con las observadas en el gel PFGE-S1 inicial.

**Nota:** después de haber sido expuesta, la membrana pudo ser reutilizada para hibridar con otras sondas, lavando previamente con agua caliente (al punto de ebullición) hasta que no se detectaran restos de marca con el Geiger.

## ANEXO 3

### SOLUCIONES

#### PFGE:

##### 1. Buffer SE

75mM NaCl + 25mM EDTA, pH 8

*Stock 400 ml de NaCl 5M:*

Pesar 58.44 g de NaCl, disolver en agitación y aforar a 400 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

*Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH=8:*

Pesar 18.612 g de EDTA, disolver en agitación, ajustar a pH 8 con lentejas de NaOH y aforar a 100 ml con agua destilada.

*Preparación:* 100 ml

Mezclar 1.5 ml de NaCl 5M + 5 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 100 ml y esterilizar a 15 libras por 15 min.

##### 2. Buffer TE

10mM Tris y 1mM EDTA

*Stock 100 ml de Tris 1M:*

Pesar 3.028 g de Tris, disolver en agitación y aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

*Stock 100 ml de EDTA 0.5M pH= 8:*

Usar el stock de la solución anterior.

*Preparación:* 1L

Mezclar 10 ml de Tris 1M + 2 ml de EDTA 0.5M pH= 8, aforar a 1L y esterilizar a 15 libras por 15 min

##### 3. Buffer de lisis

50 mM Tris; 50 mM EDTA, pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K.

*Preparación:* 100 ml

Mezclar 5 ml de Tris 1M + 10 ml de EDTA 0.5M pH= 8 + 80 ml de H<sub>2</sub>O y esterilizar a 15 libras por 15 min. Dejar enfriar y agregar 5 ml de sarcosil al 20%.

Al momento de utilizar, agregar 495  $\mu$ l de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®) y mezclar por inversión.

**Hibridaciones:**

**1. SSC 20X**

*Preparación:* 300 ml

Pesar 52.59g de NaCl + 26.46 g de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , disolver en agitación, ajustar a pH 7 y aforar a 300 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Esterilizar a 15 libras por 15 min.

**2. SDS 10%**

*Preparación:* 30 ml

Esterilizar 30 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, dejar enfriar un poco y agregar paulatinamente 3 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), mezclar por inversión y dejar reposar para quitar la espuma generada.

**3.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5M pH= 7.2**

*Preparación:* 100 ml

Pesar 6.9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , disolver en agitación y ajustar a pH 7.2. Esterilizar a 15 libras por 15 min.

**4. SSPE 20X**

NaCl 3M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ , EDTA 20mM, pH= 7.4

*Preparación:* 400 ml

Pesar 70 g de NaCl + 10.68 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  + 2.96 g de EDTA, ajustar a pH 8 y aforar a 400 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Esterilizar a 15 libras por 15 min.

## ANEXO 4

### MODELO CREADO CON EL SOFTWARE STATGRAPHICS PARA DETERMINAR EL TAMAÑO DE LOS PLÁSMIDOS

#### CEPAS AISLADAS DE PERROS

#### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo log-X es el que arroja el valores más alto de R-Cuadrada con 99.9218%. Este es 1.88059% mayor que el modelo lineal seleccionado.

#### Regresión Simple - Peso molecular vs. Distancia de migración

Variable dependiente: Peso molecular (kb)

Variable independiente: Distancia de migración (Cm)

Log-X:  $Y = a + b \cdot \ln(X)$

#### Coefficientes

|                  | <i>Mínimos Cuadrados</i> | <i>Estándar</i> | <i>Estadístico</i> |                |
|------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| <i>Parámetro</i> | <i>Estimado</i>          | <i>Error</i>    | <i>T</i>           | <i>Valor-P</i> |
| Intercepto       | 610.502                  | 3.77222         | 161.842            | 0.0000         |
| Pendiente        | -266.25                  | 2.06563         | -128.895           | 0.0000         |

#### Análisis de Varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo        | 73326.0                  | 1         | 73326.0               | 16614.0<br>3   | 0.0000         |
| Residuo       | 57.3754                  | 13        | 4.4135                |                |                |
| Total (Corr.) | 73383.3                  | 14        |                       |                |                |

Coefficiente de Correlación = -0.999609

R-cuadrada = 99.9218 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9158 por ciento

Error estándar del est. = 2.10083

Error absoluto medio = 1.41488

Estadístico Durbin-Watson = 1.6355 (P=0.1458)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.140514

**El StatAdvisor**

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-X para describir la relación entre Peso molecular y Distancia de migración. La ecuación del modelo ajustado es:

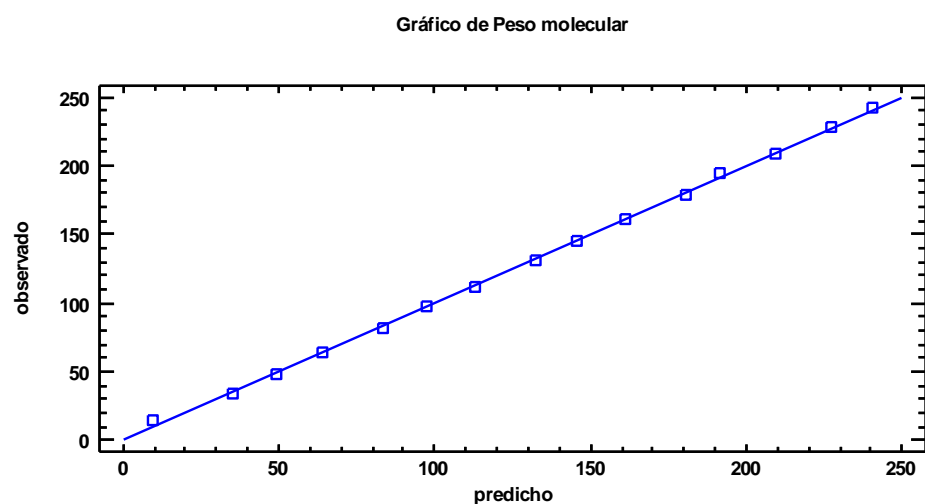
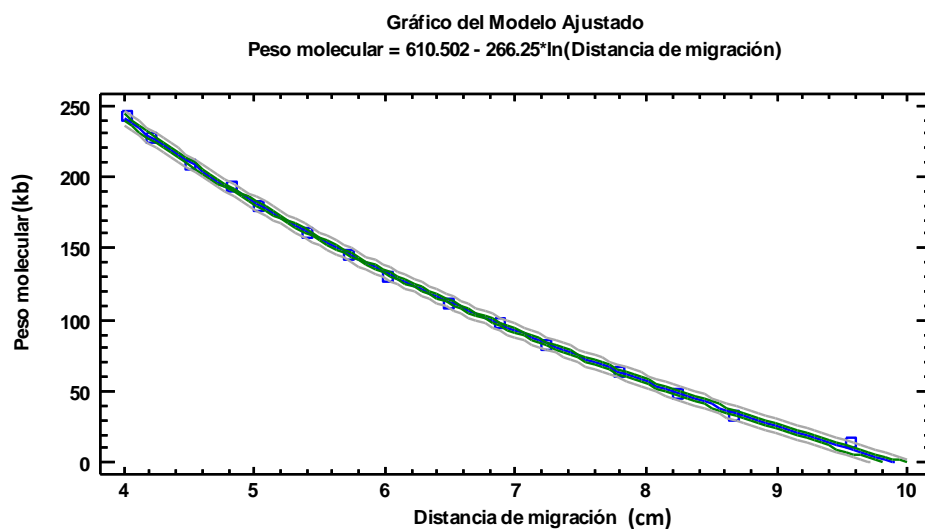
$$\text{Peso molecular} = 610.502 - 266.25 * \ln(\text{Distancia de migración})$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Peso molecular y Distancia de migración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9218% de la variabilidad en Peso molecular después de transformar a una escala  $Y/(1-Y)$  para linerizar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a -0.999609, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 2.10083.

El error absoluto medio (MAE) de 1.41488 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95.0%.





### El StatAdvisor

La siguiente tabla muestra los valores predichos para Peso molecular usando el modelo ajustado. Además de las mejores predicciones, la tabla muestra:

- (1) intervalos de previsión del 95.0% para las nuevas observaciones
- (2) intervalos de confianza del 95.0% para la media de varias observaciones

Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a las cotas internas y externas en la gráfica del modelo ajustado.

## Valores Predichos

|      |              | 95.00%   |            | 95.00%   |           |
|------|--------------|----------|------------|----------|-----------|
|      | Predicciones | Límite   | Predicción | Límite   | Confianza |
| X    | Y            | Inferior | Superior   | Inferior | Superior  |
| 4.02 | 240.073      | 235.031  | 245.114    | 237.878  | 242.268   |
| 9.56 | 9.41907      | 4.31893  | 14.5192    | 7.09255  | 11.7456   |

| Cepa                       | Predicciones |         | Aproximación | Límite   |          | Predicción | Límite   |          | Confianza |
|----------------------------|--------------|---------|--------------|----------|----------|------------|----------|----------|-----------|
|                            | X            | Y       |              | Inferior | Superior |            | Inferior | Superior |           |
| C7200                      | 6.25         | 122.577 | 125          | 117.888  | 127.266  | 127.266    | 121.4    | 123.754  |           |
| C7200                      | 6.72         | 103.272 | 105          | 98.5643  | 107.98   | 107.98     | 102.021  | 104.523  |           |
| TcC7200/C600               | 6.25         | 122.577 | 125          | 117.888  | 127.266  | 127.266    | 121.4    | 123.754  |           |
| C7201                      | 4.55         | 207.099 | 210          | 202.234  | 211.964  | 211.964    | 205.346  | 208.852  |           |
| C7201                      | 6.03         | 132.118 | 135          | 127.43   | 136.806  | 136.806    | 130.945  | 133.291  |           |
| C7201                      | 6.83         | 98.9491 | 100          | 94.2341  | 103.664  | 103.664    | 97.6714  | 100.227  |           |
| C7201                      | 8.22         | 49.6275 | 50           | 44.7534  | 54.5016  | 54.5016    | 47.8504  | 51.4045  |           |
| C7201                      | 8.52         | 40.0834 | 40           | 35.1631  | 45.0038  | 45.0038    | 38.1832  | 41.9837  |           |
| C7201                      | 9.73         | 4.72611 | 5            | 0.405542 | 9.85775  | 9.85775    | 2.3313   | 7.12091  |           |
| TcC7201/J53 <sup>Rif</sup> | 6.78         | 100.905 | 100          | 96.1938  | 105.617  | 105.617    | 99.6404  | 102.17   |           |
| C7203                      | 5.62         | 150.866 | 150          | 146.165  | 155.567  | 155.567    | 149.64   | 152.092  |           |
| C7203                      | 6.36         | 117.932 | 120          | 113.24   | 122.623  | 122.623    | 116.744  | 119.119  |           |
| C7203                      | 6.85         | 98.1706 | 100          | 93.4541  | 102.887  | 102.887    | 96.8876  | 99.4536  |           |
| C7204                      | 5.78         | 143.392 | 145          | 138.698  | 148.085  | 148.085    | 142.196  | 144.587  |           |
| C7204                      | 6.68         | 104.862 | 105          | 100.156  | 109.567  | 109.567    | 103.62   | 106.103  |           |
| C7204                      | 8.22         | 49.6275 | 50           | 44.7534  | 54.5016  | 54.5016    | 47.8504  | 51.4045  |           |
| TcC7204/C600               | 6.7          | 104.066 | 105          | 99.3591  | 108.772  | 108.772    | 102.82   | 105.312  |           |
| TcC7204/C600               | 9.17         | 20.5085 | 20           | 15.4787  | 25.5383  | 25.5383    | 18.3405  | 22.6765  |           |
| C7205                      | 5.58         | 152.768 | 150          | 148.064  | 157.472  | 157.472    | 151.532  | 154.004  |           |
| C7205                      | 8.33         | 46.0882 | 45           | 41.1975  | 50.9788  | 50.9788    | 44.2661  | 47.9102  |           |
| TcC7205/J53 <sup>Rif</sup> | 5.58         | 152.768 | 150          | 148.064  | 157.472  | 157.472    | 151.532  | 154.004  |           |
| C7206                      | 6.38         | 117.096 | 120          | 112.404  | 121.788  | 121.788    | 115.906  | 118.285  |           |
| C7207                      | 6.06         | 130.797 | 130          | 126.109  | 135.484  | 135.484    | 129.624  | 131.969  |           |
| C7207                      | 7.39         | 77.9678 | 80           | 73.2019  | 82.7336  | 82.7336    | 76.5137  | 79.4219  |           |
| C7207                      | 8.01         | 56.5179 | 55           | 51.6742  | 61.3616  | 61.3616    | 54.8259  | 58.2098  |           |
| TcC7207/C600               | 7.39         | 77.9678 | 80           | 73.2019  | 82.7336  | 82.7336    | 76.5137  | 79.4219  |           |
| C7208                      | 4.04         | 238.752 | 240          | 233.718  | 243.785  | 243.785    | 236.575  | 240.928  |           |
| C7208                      | 6.03         | 132.118 | 135          | 127.43   | 136.806  | 136.806    | 130.945  | 133.291  |           |
| C7208                      | 6.51         | 111.725 | 110          | 107.028  | 116.422  | 116.422    | 110.517  | 112.934  |           |
| C7208                      | 6.76         | 101.692 | 100          | 96.9817  | 106.402  | 106.402    | 100.432  | 102.952  |           |
| C7209                      | 3.09         | 286.459 | 285          | 281.24   | 291.677  | 291.677    | 283.661  | 289.256  |           |
| C7209                      | 5.36         | 150.173 | 150          | 101.608  | 110.739  | 110.739    | 104.975  | 107.372  |           |
| C7209                      | 6.77         | 82.4571 | 80           | 77.8436  | 87.0706  | 87.0706    | 81.0876  | 83.8266  |           |
| TcC7209/J53 <sup>Rif</sup> | 5.36         | 150.173 | 150          | 101.608  | 110.739  | 110.739    | 104.975  | 107.372  |           |

## CEPAS AISLADAS DE TORTUGAS

### Regresión Simple - Peso Molecular vs. Distancia de Migración

Variable dependiente: Peso Molecular (Kb)

Variable independiente: Distancia de Migración (Milímetros)

Raíz Cuadrada de Y:  $Y = (a + b * X)^2$

#### Coefficientes

|                  | <i>Mínimos Cuadrados</i> | <i>Estándar</i> | <i>Estadístico</i> |                |
|------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| <i>Parámetro</i> | <i>Estimado</i>          | <i>Error</i>    | <i>T</i>           | <i>Valor-P</i> |
| Intercepto       | 23.1383                  | 0.0663045       | 348.97             | 0.0000         |
| Pendiente        | -0.245662                | 0.0012762<br>1  | -192.494           | 0.0000         |

#### Análisis de Varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo        | 176.146                  | 1         | 176.146               | 37053.76       | 0.0000         |
| Residuo       | 0.0617994                | 13        | 0.0047538             |                |                |
| Total (Corr.) | 176.208                  | 14        |                       |                |                |

Coefficiente de Correlación = -0.999825

R-cuadrada = 99.9649 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9622 por ciento

Error estándar del est. = 0.0689478

Error absoluto medio = 0.0551237

Estadístico Durbin-Watson = 1.07778 (P=0.0111)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.358085

#### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo raíz cuadrada-Y para describir la relación entre Peso Molecular y Distancia de Migración. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Peso Molecular} = (23.1383 - 0.245662 * \text{Distancia de Migración})^2$$

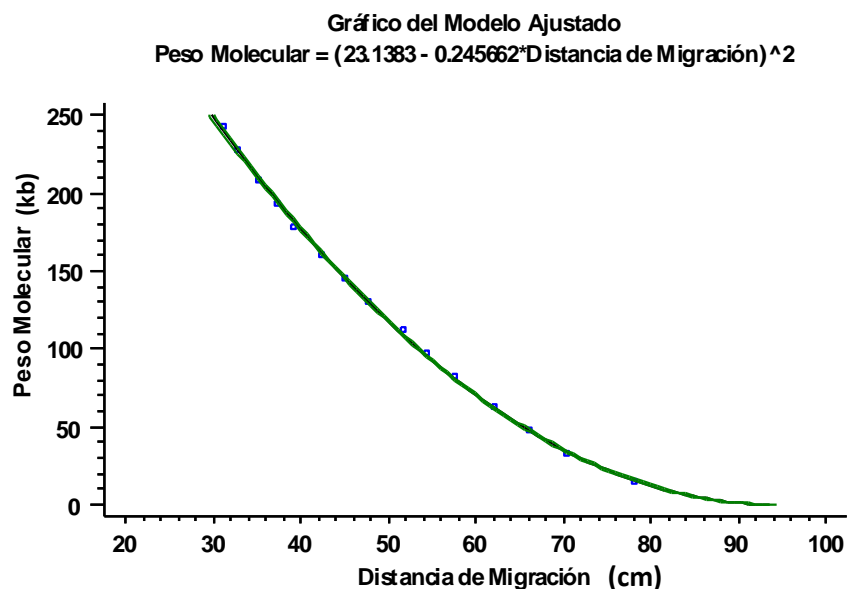
Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Peso Molecular y Distancia de Migración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9649% de la variabilidad en Peso Molecular después de transformar a una escala logarítmica para linearizar el modelo.

El coeficiente de correlación es igual a -0.999825, indicando una relación relativamente fuerte

entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.0689478. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

El error absoluto medio (MAE) de 0.0551237 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95.0%. Grafique los residuos versus el número de fila para ver si hay algún patrón que pueda detectarse.



### El StatAdvisor

Esta tabla muestra los resultados de ajustar varios modelos curvilíneos a los datos. De los modelos ajustados, el modelo raíz cuadrada-Y es el que arroja el valor más alto de R-Cuadrada con 99.9649%. Este es el modelo actualmente seleccionado.

## Valores Predichos

| Cepa      |          |                     |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|-----------|----------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|           |          | <i>Predicciones</i> | <i>Aproximación</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
|           | <i>X</i> | <i>Y</i>            |                     | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| C7210     | 4.17     | 166.26              | 170                 | 162.272         | 170.295           | 165.106         | 167.417          |
| C7210     | 5.68     | 84.3583             | 85                  | 81.5358         | 87.2289           | 83.5752         | 85.1451          |
| C7210     | 6.67     | 45.598              | 45                  | 43.4556         | 47.7919           | 44.7927         | 46.4104          |
| C7211     | 4.77     | 130.421             | 130                 | 126.928         | 133.962           | 129.532         | 131.313          |
| C7211     | 5.54     | 90.7943             | 90                  | 87.873          | 93.7634           | 90.011          | 91.5811          |
| C7212     | 3.42     | 217.168             | 220                 | 212.481         | 221.907           | 215.456         | 218.887          |
| C7212     | 4.20     | 164.365             | 165                 | 160.403         | 168.374           | 163.228         | 165.505          |
| C7212     | 5.00     | 117.835             | 120                 | 114.519         | 121.198           | 117.001         | 118.671          |
| C7212     | 5.70     | 83.4582             | 85                  | 80.6497         | 86.3148           | 82.6749         | 84.2452          |
| C7214     | 4.77     | 130.421             | 130                 | 126.928         | 133.962           | 129.532         | 131.313          |
| C7214     | 5.54     | 90.7943             | 90                  | 87.873          | 93.7634           | 90.011          | 91.5811          |
| C7215     | 4.73     | 132.675             | 135                 | 129.151         | 136.247           | 131.774         | 133.58           |
| C7215     | 5.33     | 100.892             | 100                 | 97.8199         | 104.011           | 100.1           | 101.687          |
| TcC7214-1 | 4.77     | 130.421             | 130                 | 126.928         | 133.962           | 129.532         | 131.313          |
| TcC7214-1 | 5.54     | 90.7943             | 90                  | 87.873          | 93.7634           | 90.011          | 91.5811          |
| C7216     | 5.41     | 96.9824             | 95                  | 93.9682         | 100.044           | 96.1952         | 97.7729          |
| C7216     | 5.96     | 72.196              | 70                  | 69.5681         | 74.8727           | 71.4061         | 72.9904          |
| C7218     | 4.85     | 125.971             | 125                 | 122.54          | 129.449           | 125.104         | 126.841          |
| C7218     | 5.33     | 100.892             | 100                 | 97.8199         | 104.011           | 100.1           | 101.687          |
| C7219     | 3.76     | 193.248             | 195                 | 188.891         | 197.656           | 191.818         | 194.684          |
| C7219     | 5.54     | 90.7943             | 90                  | 87.873          | 93.7634           | 90.011          | 91.5811          |
| C7219     | 6.03     | 69.3033             | 70                  | 66.7236         | 71.932            | 68.5109         | 70.1003          |
| TcC7219   | 5.33     | 100.892             | 100                 | 97.8199         | 104.011           | 100.1           | 101.687          |
| C7220     | 4.85     | 125.971             | 125                 | 122.54          | 129.449           | 125.104         | 126.841          |
| C7220     | 5.33     | 100.892             | 100                 | 97.8199         | 104.011           | 100.1           | 101.687          |
| C7221     | 4.49     | 146.605             | 145                 | 142.888         | 150.37            | 145.614         | 147.599          |
| C7221     | 5.01     | 117.302             | 120                 | 113.994         | 120.658           | 116.471         | 118.137          |
| C7221     | 6.12     | 65.671              | 65                  | 63.153          | 68.2383           | 64.8754         | 66.4715          |
| TcC7221   | 5.00     | 117.835             | 120                 | 114.519         | 121.198           | 117.001         | 118.671          |
| C7222     | 3.83     | 188.497             | 190                 | 184.205         | 192.839           | 187.119         | 189.88           |
| C7222     | 4.55     | 143.057             | 145                 | 139.389         | 146.773           | 142.091         | 144.027          |
| C7222     | 5.62     | 87.0876             | 85                  | 84.2229         | 90.0003           | 86.3049         | 87.874           |
| TcC7222   | 5.62     | 87.0876             | 85                  | 84.2229         | 90.0003           | 86.3049         | 87.874           |

## CEPAS AISLADAS DE VOLUNTARIOS SANOS

### Regresión Simple - Peso molecular vs. Distancia de migración

Variable dependiente: Peso molecular (kb)

Variable independiente: Distancia de migración (cm)

Log-X:  $Y = a + b \cdot \ln(X)$

#### Coefficientes

|                  | <i>Mínimos Cuadrados</i> | <i>Estándar</i> | <i>Estadístico</i> |                |
|------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| <i>Parámetro</i> | <i>Estimado</i>          | <i>Error</i>    | <i>T</i>           | <i>Valor-P</i> |
| Intercepto       | 521.98                   | 9.27845         | 56.2572            | 0.0000         |
| Pendiente        | -241.704                 | 5.62368         | -42.9797           | 0.0000         |

#### Análisis de Varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo        | 72870.5                  | 1         | 72870.5               | 1847.25        | 0.0000         |
| Residuo       | 512.825                  | 13        | 39.4481               |                |                |
| Total (Corr.) | 73383.3                  | 14        |                       |                |                |

Coefficiente de Correlación = -0.9965

R-cuadrada = 99.3012 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.2474 por ciento

Error estándar del est. = 6.28077

Error absoluto medio = 3.68399

Estadístico Durbin-Watson = 2.51906 (P=0.7737)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.287469

#### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-X para describir la relación entre Peso molecular y Distancia de migración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Peso molecular} = 521.98 - 241.704 \cdot \ln(\text{Distancia de migración})$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Peso molecular y Distancia de migración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.3012% de la variabilidad en Peso molecular después de transformar a una escala  $Y/(1-Y)$  para linerizar el modelo. El

coeficiente de correlación es igual a -0.9965, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 6.28077. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

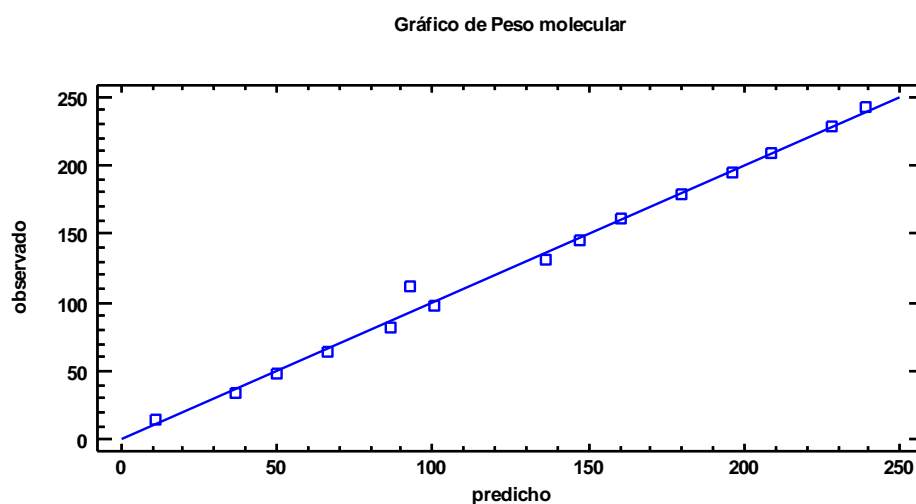
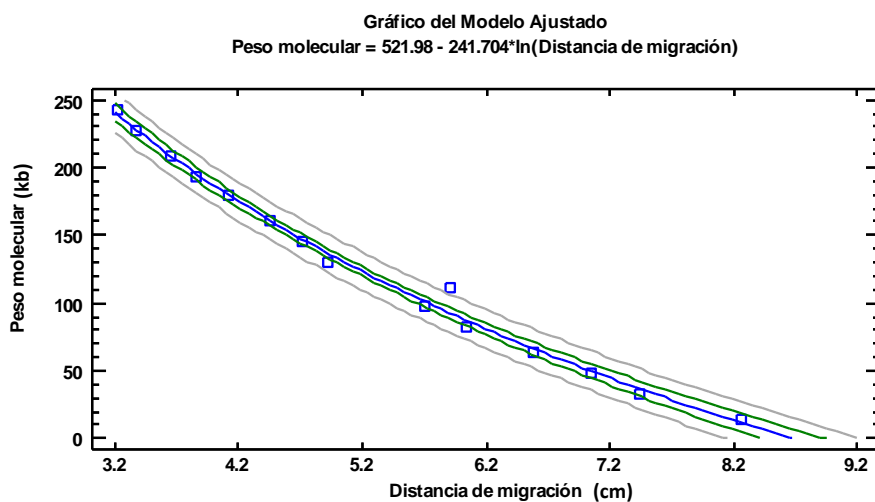
El error absoluto medio (MAE) de 3.68399 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95.0%.

#### **Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste**

| <i>Fuente</i>      | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo             | 72870.5                  | 1         | 72870.5               | 1847.25        | 0.0000         |
| Residuo            | 512.825                  | 13        | 39.4481               |                |                |
| Carencia de Ajuste | 512.825                  | 13        | 39.4481               |                |                |
| Error Puro         | 0                        | 0         |                       |                |                |
| Total (Corr.)      | 73383.3                  | 14        |                       |                |                |

#### **El StatAdvisor**

La prueba de Falta de Ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente X.



### El StatAdvisor

La siguiente tabla muestra los valores predichos para Peso molecular usando el modelo ajustado. Además de las mejores predicciones, la tabla muestra:

- (1) intervalos de previsión del 95.0% para las nuevas observaciones
- (2) intervalos de confianza del 95.0% para la media de varias observaciones

Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a las cotas internas y externas en la gráfica del modelo ajustado.



**Valores Predichos**

|          |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|----------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|          | <i>Predicciones</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
| <i>X</i> | <i>Y</i>            | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| 3.23     | 238.586             | 223.535         | 253.638           | 232.072         | 245.1            |
| 8.27     | 11.3479             | -<br>3.86909    | 26.565            | 4.45987         | 18.236           |

**Valores Predichos**

| Cepa    |          |                     |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|---------|----------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|         |          | <i>Predicciones</i> | <i>Aproximación</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
|         | <i>X</i> | <i>Y</i>            |                     | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| C7223   | 5.14     | 126.298             | 125                 | 112.283         | 140.312           | 122.791         | 129.805          |
| C7223   | 7.08     | 48.8992             | 50                  | 34.3138         | 63.4846           | 43.5494         | 54.249           |
| C7224   | 4.69     | 148.443             | 150                 | 134.396         | 162.49            | 144.81          | 152.076          |
| C7225   | 5.1      | 128.186             | 130                 | 114.172         | 142.2             | 124.682         | 131.69           |
| C7226   | 5.31     | 118.433             | 120                 | 104.409         | 132.458           | 114.887         | 121.979          |
| C7227   | 4.15     | 178.009             | 180                 | 163.783         | 192.235           | 173.736         | 182.282          |
| C7227   | 8.95     | -7.75127            | 8                   | -23.3675        | 7.86496           | -15.4813        | -0.0212001       |
| C7230   | 4.57     | 154.708             | 155                 | 140.636         | 168.779           | 150.979         | 158.436          |
| C7231   | 4.7      | 147.928             | 150                 | 133.883         | 161.973           | 144.302         | 151.554          |
| C7231   | 5.9      | 92.967              | 90                  | 78.8345         | 107.1             | 89.0154         | 96.9187          |
| C7234   | 4.7      | 147.928             | 150                 | 133.883         | 161.973           | 144.302         | 151.554          |
| C7234   | 5.9      | 92.967              | 90                  | 78.8345         | 107.1             | 89.0154         | 96.9187          |
| C7235   | 2.98     | 258.058             | 260                 | 242.622         | 273.493           | 250.7           | 265.416          |
| C7235   | 5.27     | 120.261             | 120                 | 106.239         | 134.282           | 116.728         | 123.794          |
| C7235   | 5.73     | 100.034             | 100                 | 85.9427         | 114.125           | 96.2333         | 103.834          |
| C7235   | 7.47     | 35.9388             | 35                  | 21.1596         | 50.718            | 30.0811         | 41.7964          |
| C7236   | 2.98     | 258.058             | 260                 | 242.622         | 273.493           | 250.7           | 265.416          |
| C7236   | 5.27     | 120.261             | 120                 | 106.239         | 134.282           | 116.728         | 123.794          |
| C7236   | 5.73     | 100.034             | 100                 | 85.9427         | 114.125           | 96.2333         | 103.834          |
| C7236   | 7.49     | 35.2925             | 35                  | 20.503          | 50.0821           | 29.4088         | 41.1762          |
| C7239   | 4.82     | 141.834             | 140                 | 127.806         | 155.862           | 138.275         | 145.394          |
| TcC7239 | 4.82     | 141.834             | 140                 | 127.806         | 155.862           | 138.275         | 145.394          |

## CEPAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS (GEL 1)

### Regresión Simple - Peso molecular vs. Distancia de migración

Variable dependiente: Peso molecular (kb)

Variable independiente: Distancia de migración (cm)

Raíz Cuadrada de Y:  $Y = (a + b \cdot X)^2$

#### Coefficientes

|            | Mínimos Cuadrados | Estándar  | Estadístico |         |
|------------|-------------------|-----------|-------------|---------|
| Parámetro  | Estimado          | Error     | T           | Valor-P |
| Intercepto | 23.8273           | 0.103778  | 229.6       | 0.0000  |
| Pendiente  | -1.98446          | 0.0153367 | -129.392    | 0.0000  |

#### Análisis de Varianza

| Fuente        | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F  | Valor-P |
|---------------|-------------------|----|----------------|----------|---------|
| Modelo        | 176.071           | 1  | 176.071        | 16742.41 | 0.0000  |
| Residuo       | 0.136714          | 13 | 0.0105165      |          |         |
| Total (Corr.) | 176.208           | 14 |                |          |         |

Coefficiente de Correlación = -0.999612

R-cuadrada = 99.9224 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9164 por ciento

Error estándar del est. = 0.10255

Error absoluto medio = 0.0848529

Estadístico Durbin-Watson = 0.808423 (P=0.0014)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.477755

#### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo raíz cuadrada-Y para describir la relación entre Peso molecular y Distancia de migración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Peso molecular} = (23.8273 - 1.98446 \cdot \text{Distancia de migración})^2$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Peso molecular y Distancia de migración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9224% de la variabilidad en Peso molecular después de transformar a una escala logarítmica para linearizar el modelo. El coeficiente de correlación es igual a -0.999612, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.10255. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

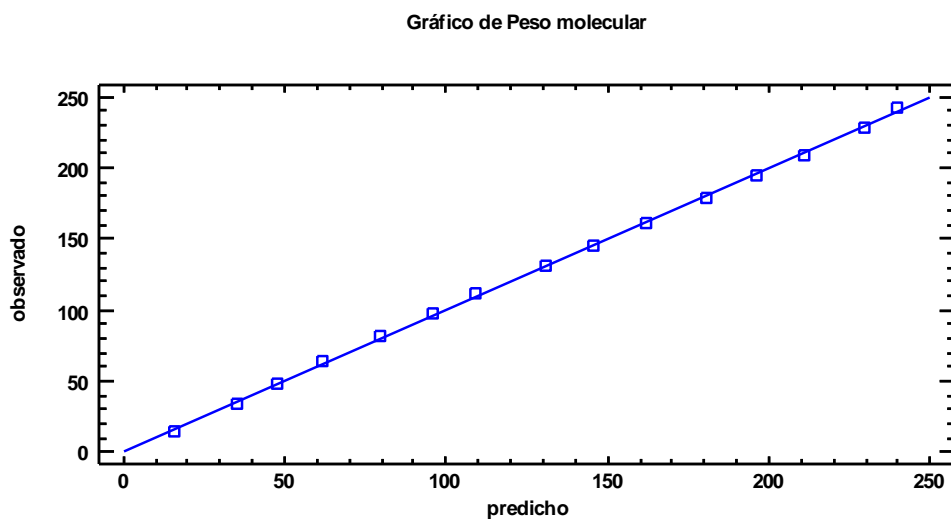
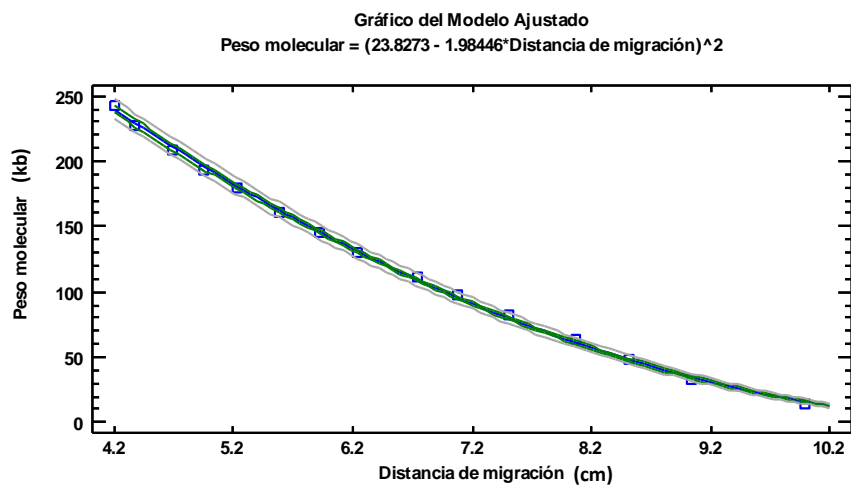
El error absoluto medio (MAE) de 0.0848529 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95.0%.

#### **Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste**

| <i>Fuente</i>      | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo             | 176.071                  | 1         | 176.071               | 16742.41       | 0.0000         |
| Residuo            | 0.136714                 | 13        | 0.0105165             |                |                |
| Carencia de Ajuste | 0.136714                 | 13        | 0.0105165             |                |                |
| Error Puro         | 0                        | 0         |                       |                |                |
| Total (Corr.)      | 176.208                  | 14        |                       |                |                |

#### **El StatAdvisor**

La prueba de Falta de Ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente X.



### El StatAdvisor

La siguiente tabla muestra los valores predichos para Peso molecular usando el modelo ajustado. Además de las mejores predicciones, la tabla muestra:

- (1) intervalos de previsión del 95.0% para las nuevas observaciones
- (2) intervalos de confianza del 95.0% para la media de varias observaciones

Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a las cotas internas y externas en la gráfica del modelo ajustado.

## Valores Predichos

|          |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|----------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|          | <i>Predicciones</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
| <i>X</i> | <i>Y</i>            | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| 4.21     | 239.407             | 231.992         | 246.939           | 236.441         | 242.392          |
| 9.98     | 16.1803             | 14.1895         | 18.3019           | 15.1713         | 17.2219          |

| Cepa  |          |                     |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|-------|----------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|       |          | <i>Predicciones</i> | <i>Aproximación</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
|       | <i>X</i> | <i>Y</i>            |                     | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| C4425 | 5.78     | 152.7               | 150                 | 147.064         | 158.443           | 151.159         | 154.25           |
| C4428 | 6.04     | 140.215             | 140                 | 134.834         | 145.701           | 138.807         | 141.629          |
| C4429 | 5.01     | 192.799             | 190                 | 186.346         | 199.363           | 190.681         | 194.929          |
| C4429 | 5.33     | 175.568             | 175                 | 169.465         | 181.778           | 173.72          | 177.425          |
| C4429 | 5.48     | 167.768             | 170                 | 161.824         | 173.819           | 166.032         | 169.513          |
| C4429 | 7.36     | 85.0407             | 85                  | 80.8443         | 89.3434           | 83.8774         | 86.212           |
| C4429 | 10.08    | 14.6232             | 15                  | 12.7231         | 16.6555           | 13.6428         | 15.6377          |
| C4430 | 3.31     | 297.866             | 300                 | 289.209         | 306.65            | 293.69          | 302.072          |
| C4430 | 3.62     | 277.01              | 280                 | 268.801         | 285.342           | 273.279         | 280.766          |
| C4430 | 4.24     | 237.568             | 235                 | 230.191         | 245.062           | 234.638         | 240.517          |
| C4430 | 4.85     | 201.718             | 200                 | 195.081         | 208.465           | 199.449         | 204.0            |
| C4430 | 5.52     | 165.718             | 165                 | 159.816         | 171.727           | 164.011         | 167.434          |
| C4430 | 6.23     | 131.428             | 130                 | 126.228         | 136.732           | 130.098         | 132.764          |
| C4430 | 9.87     | 17.9841             | 20                  | 15.8944         | 20.2028           | 16.9461         | 19.053           |
| C4432 | 4.04     | 249.961             | 250                 | 242.324         | 257.715           | 246.785         | 253.156          |
| C4432 | 5.61     | 161.152             | 160                 | 155.343         | 167.067           | 159.505         | 162.807          |
| C4432 | 6.02     | 141.156             | 140                 | 135.756         | 146.662           | 139.74          | 142.58           |
| C4432 | 8.8      | 40.5022             | 40                  | 37.4962         | 43.6242           | 39.3126         | 41.7096          |
| C4432 | 9.29     | 29.071              | 30                  | 26.4762         | 31.7871           | 27.9232         | 30.2419          |
| C4435 | 6.26     | 130.066             | 130                 | 124.895         | 135.342           | 128.747         | 131.392          |

## CEPAS AISLADAS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS (GEL 2)

### Regresión Simple - Peso molecular vs. Distancia de migración

Variable dependiente: Peso molecular (kb)

Variable independiente: Distancia de migración (cm)

Log-X:  $Y = a + b \cdot \ln(X)$

#### Coefficientes

|                  | <i>Mínimos Cuadrados</i> | <i>Estándar</i> | <i>Estadístico</i> |                |
|------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| <i>Parámetro</i> | <i>Estimado</i>          | <i>Error</i>    | <i>T</i>           | <i>Valor-P</i> |
| Intercepto       | 579.892                  | 3.4336          | 168.887            | 0.0000         |
| Pendiente        | -260.096                 | 1.95869         | -132.791           | 0.0000         |

#### Análisis de Varianza

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo        | 73329.3                  | 1         | 73329.3               | 17633.4<br>4   | 0.0000         |
| Residuo       | 54.0609                  | 13        | 4.15853               |                |                |
| Total (Corr.) | 73383.3                  | 14        |                       |                |                |

Coefficiente de Correlación = -0.999632

R-cuadrada = 99.9263 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.9207 por ciento

Error estándar del est. = 2.03925

Error absoluto medio = 1.37282

Estadístico Durbin-Watson = 2.13196 (P=0.4809)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.279501

#### El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-X para describir la relación entre Peso molecular y Distancia de migración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Peso molecular} = 579.892 - 260.096 \cdot \ln(\text{Distancia de migración})$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Peso molecular y Distancia de migración con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.9263% de la variabilidad en Peso molecular después de transformar a una escala  $Y/(1-Y)$  para linerizar el modelo. El

coeficiente de correlación es igual a  $-0.999632$ , indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es  $2.03925$ . Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

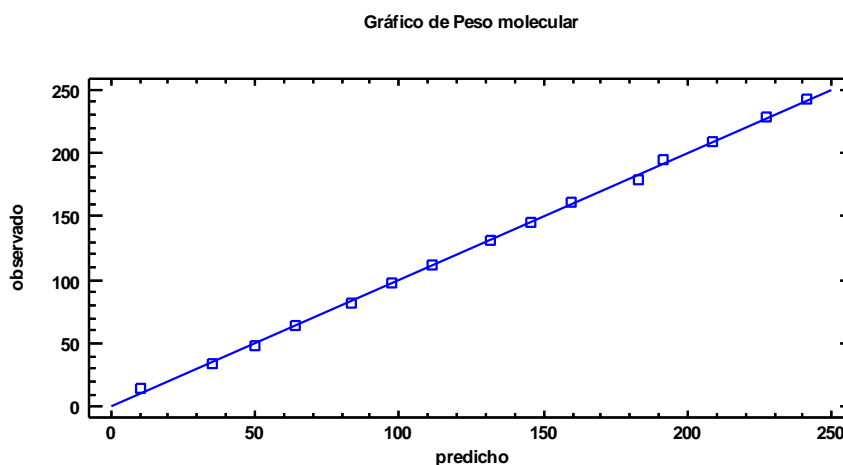
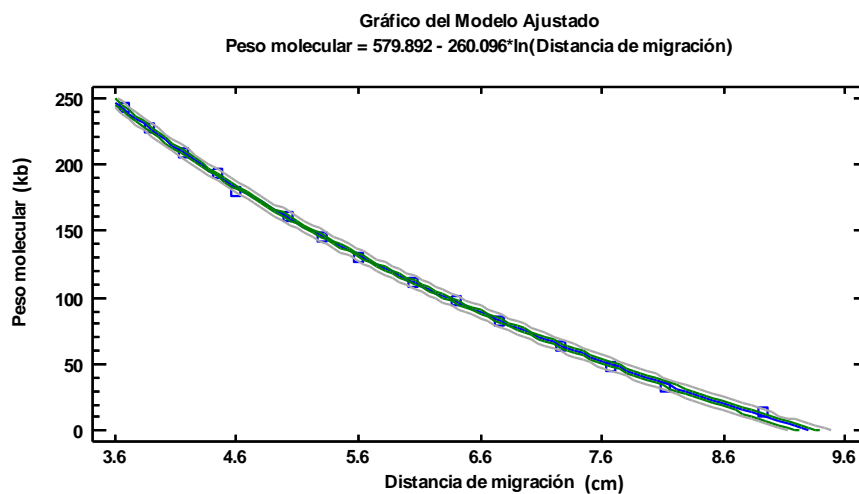
El error absoluto medio (MAE) de  $1.37282$  es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que  $0.05$ , no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del  $95.0\%$ .

#### **Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste**

| <i>Fuente</i>      | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Modelo             | 73329.3                  | 1         | 73329.3               | 17633.4<br>4   | 0.0000         |
| Residuo            | 54.0609                  | 13        | 4.15853               |                |                |
| Carencia de Ajuste | 54.0609                  | 13        | 4.15853               |                |                |
| Error Puro         | 0                        | 0         |                       |                |                |
| Total (Corr.)      | 73383.3                  | 14        |                       |                |                |

#### **El StatAdvisor**

La prueba de Falta de Ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente X.



### El StatAdvisor

La siguiente tabla muestra los valores predichos para Peso molecular usando el modelo ajustado. Además de las mejores predicciones, la tabla muestra:

- (1) intervalos de previsión del 95.0% para las nuevas observaciones
- (2) intervalos de confianza del 95.0% para la media de varias observaciones

Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a las cotas internas y externas en la gráfica del modelo ajustado.



**Valores Predichos**

|          |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|----------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|          | <i>Predicciones</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
| <i>X</i> | <i>Y</i>            | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| 3.68     | 241.009             | 236.11          | 245.908           | 238.865         | 243.152          |
| 8.93     | 10.4324             | 5.48825         | 15.3765           | 8.18834         | 12.6765          |

**Valores Predichos**

| Cepa                       |          |                     |                     | 95.00%          |                   | 95.00%          |                  |
|----------------------------|----------|---------------------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|
|                            |          | <i>Predicciones</i> | <i>Aproximación</i> | <i>Límite</i>   | <i>Predicción</i> | <i>Límite</i>   | <i>Confianza</i> |
|                            | <i>X</i> | <i>Y</i>            |                     | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>   | <i>Inferior</i> | <i>Superior</i>  |
| C4426                      | 5.86     | 120.002             | 120                 | 115.45          | 124.555           | 118.855         | 121.15           |
| C4426                      | 5.65     | 129.494             | 130                 | 124.944         | 134.044           | 128.357         | 130.632          |
| C4426                      | 5.5      | 136.493             | 135                 | 131.941         | 141.044           | 135.349         | 137.636          |
| TcC4426/C600               | 5.87     | 119.559             | 120                 | 115.006         | 124.112           | 118.41          | 120.707          |
| TcC4426/J53 <sup>Rif</sup> | 5.77     | 124.028             | 125                 | 119.477         | 128.579           | 122.887         | 125.169          |
| C4427                      | 5.5      | 136.493             | 135                 | 131.941         | 141.044           | 135.349         | 137.636          |
| TcC4427/C600               | 5.52     | 135.549             | 135                 | 130.998         | 140.1             | 134.407         | 136.691          |
| C4431                      | 2.11     | 385.681             | 385                 | 379.509         | 391.853           | 381.358         | 390.004          |
| C4431                      | 2.48     | 343.657             | 345                 | 337.925         | 349.389           | 339.989         | 347.325          |
| C4431                      | 2.77     | 314.893             | 315                 | 309.433         | 320.354           | 311.667         | 318.119          |
| C4431                      | 3.17     | 279.81              | 280                 | 274.644         | 284.977           | 277.111         | 282.51           |
| C4431                      | 3.62     | 245.285             | 245                 | 240.359         | 250.21            | 243.082         | 247.487          |
| C4431                      | 4.15     | 209.746             | 210                 | 205.012         | 214.481           | 208.013         | 211.48           |
| C4431                      | 4.71     | 176.824             | 175                 | 172.208         | 181.439           | 175.448         | 178.199          |
| C4431                      | 5.46     | 138.391             | 140                 | 133.839         | 142.944           | 137.244         | 139.538          |
| C4431                      | 8.67     | 18.1176             | 20                  | 13.221          | 23.0142           | 15.9804         | 20.2548          |
| TcC4431/J53 <sup>Azi</sup> | 5.41     | 140.784             | 140                 | 136.23          | 145.338           | 139.632         | 141.937          |
| C4433                      | 4.43     | 192.764             | 190                 | 188.099         | 197.43            | 191.229         | 194.3            |
| C4433                      | 6.09     | 109.989             | 110                 | 105.428         | 114.55            | 108.809         | 111.169          |
| TcC4433/J53 <sup>Rif</sup> | 4.39     | 195.124             | 195                 | 190.449         | 199.798           | 193.562         | 196.685          |
| TcC4433/J53 <sup>Rif</sup> | 6.01     | 113.428             | 115                 | 108.871         | 117.986           | 112.262         | 114.595          |
| C4436                      | 2.41     | 351.104             | 350                 | 345.297         | 356.911           | 347.321         | 354.887          |
| C4436                      | 5.41     | 140.784             | 140                 | 96.1852         | 105.333           | 99.5301         | 101.988          |
| TcC4436/J53 <sup>Rif</sup> | 2.41     | 351.104             | 350                 | 345.297         | 356.911           | 347.321         | 354.887          |
| TcC4436/J53 <sup>Rif</sup> | 3.52     | 252.571             | 250                 | 247.598         | 257.543           | 250.265         | 254.876          |
| TcC4436/J53 <sup>Rif</sup> | 4.67     | 179.042             | 180                 | 174.421         | 183.663           | 177.646         | 180.438          |
| TcC4436/J53 <sup>Rif</sup> | 6.37     | 98.2974             | 100                 | 93.7194         | 102.875           | 97.0529         | 99.5419          |

## **ANEXO 5**

# **PUBLICACIONES Y ARTÍCULOS SOMETIDOS**



## Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 $\beta$ -lactamases

R.C. Rocha-Gracia <sup>a</sup>, G. Cortés-Cortés <sup>a</sup>, P. Lozano-Zarain <sup>a</sup>, F. Bello <sup>b</sup>, Y. Martínez-Laguna <sup>a</sup>, C. Torres <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Manuel, 72570 Puebla, Mexico

<sup>b</sup> Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Manuel, 72570 Puebla, Mexico

<sup>c</sup> Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 51, Logroño 26006, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 24 December 2014

#### Keywords:

*Escherichia coli*

Extended spectrum  $\beta$ -lactamases

Canine

### ABSTRACT

The presence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli*, along with the mechanisms of antimicrobial resistance and the molecular types of isolates, was investigated in faecal samples from 53 healthy dogs in Mexico. Samples were inoculated on Levine agar plates with 2  $\mu$ g/mL cefotaxime for recovery of cefotaxime-resistant (CTX<sup>R</sup>) *E. coli*. CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates were recovered from 9/53 (17%) samples; one isolate was characterised from each positive sample. ESBL producing *E. coli* isolates were detected in 3/53 (6%) samples; these isolates carried the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and one isolate also carried *bla*<sub>SHV-2</sub>. These three ESBL-positive *E. coli* isolates belonged to phylogroup A and sequence types ST617, ST410 or ST3944. The remaining 6/53 (11%) samples contained pAmpC positive isolates; these isolates carried the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene, which encodes CMY-2  $\beta$ -lactamase. These six isolates belonged to phylogroups A ( $n = 2$ ), B1 ( $n = 1$ ) and D ( $n = 3$ ), and sequences types ST1431, ST57, ST93 and ST4565. One CMY-2  $\beta$ -lactamase positive *E. coli* isolate of lineage ST93 had the -32 mutation in the chromosomal *ampC* promoter/attenuator region. Five ESBL/pAmpC positive *E. coli* isolates carried class 1 integrons (*dfrA17-aadA5*, *aadA* and *aadA/aadB* arrays were detected in three isolates) and one isolate carried a class 2 integron (*dfrA12-sat2-aadA1*). The *aac(6')Ib-cr*, *aac(3)-II*, *qnrB19*, *tet(A)*, *tet(B)*, *cmlA*, and *sul3* genes were also detected. All studied isolates showed unrelated PFGE-patterns. To our knowledge, this is the first description of ESBL-producing *E. coli* and the second of pAmpC-producing *E. coli* from healthy dogs in America. Our results suggest the potential zoonotic role of dogs in the transmission to humans of ESBL and pAmpC *E. coli* in the household environment.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

*Escherichia coli* is a normal inhabitant of the intestinal tract of humans and most animals, including dogs. *E. coli* strains can also cause a wide variety of intestinal and extra-intestinal diseases, such as diarrhoea, urinary tract infections, septicaemia and neonatal meningitis (Croxen and Finlay, 2010), among others.

The increasing prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* isolates is a serious concern, particularly with respect to strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), both in humans and in animals (Cantón et al., 2008; Coque et al., 2008; Ben Sallem et al., 2012). ESBL-producing *E. coli* isolates from companion animals are of public health concern, due to potential transfer between

animals and humans in the household environment (Albrechtova et al., 2012). The CTX-M-15  $\beta$ -lactamase is an ESBL that has been disseminated among humans in hospitals, mainly associated with *E. coli* strain ST131-B2, although is less frequent in animals (Canton et al., 2008; Cortés et al., 2010).

Plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC)-producing *E. coli* strains are also an emerging problem in human and veterinary medicine because of the transferability of the resistance genes, that of *bla*<sub>CMY-2</sub> being reported most frequently (Jacoby, 2009; Hordijk et al., 2013). ESBL and pAmpC *E. coli* producers have been detected both in healthy and in sick dogs in different countries (Teshager et al., 2000; Costa et al., 2004; Carattoli et al., 2005; Pomba et al., 2009; Ewers et al., 2010; Sallem et al., 2013; Bortolaia et al., 2014); nevertheless, no information do exist in healthy pets in Latin America. The aim of the present study was to investigate the presence of cefotaxime-resistant (CTX<sup>R</sup>) *E. coli* strains in faecal samples of healthy dogs in Mexico, to characterise the mechanisms of resistance and to perform molecular typing of selected isolates.

\* Corresponding author. Tel.: +34 941299750.

E-mail address: [carmen.torres@unirioja.es](mailto:carmen.torres@unirioja.es) (C. Torres).

## Materials and methods

### Sample collection, and isolation and identification of *Escherichia coli*

Faeces were collected from 53 healthy dogs during the period July to November 2011 in the urban area of Puebla, Mexico. Dogs were selected at random from a questionnaire to the owners on the basis that they were healthy and had not been treated with antibiotics for at least 12 months before sampling. Fresh faecal samples were collected by the owners using a sterile cotton swab immediately after the dogs defecated and were transported in Stuart medium to the microbiology laboratory. The samples were cultured on Levine agar plates supplemented with 2 µg/mL cefotaxime and incubated for 24 h at 37 °C. Colonies with typical *E. coli* morphology were further identified by biochemical testing. Molecular identification of *E. coli* isolates was performed by PCR for the *uidA* gene (Ben Sallem et al., 2014).

### Antibiotic susceptibility testing

Susceptibility testing was performed by disc diffusion method for 18 antimicrobial agents (ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ceftioxin, aztreonam, imipenem, meropenem, nalidixic acid, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, tetracycline, trimethoprim-sulphamethoxazole and chloramphenicol; BBLTM) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain. Broad spectrum cephalosporin-resistant isolates were selected and one isolate per positive sample was retained for further studies. The double disc synergy test with cefotaxime, ceftazidime, aztreonam and cefepime in the proximity of amoxicillin-clavulanic acid was used for the screening of ESBL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013).

### Identification of antimicrobial resistance genes by PCR

The strains that showed an ESBL positive phenotype were tested for detection of ESBL encoding genes. Specific PCRs for detection of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> were performed (Belaouaj et al., 1994; Pitout et al., 1998; Pagani et al., 2003; Rocha-Gracia et al., 2010) and amplicons were sequenced, to determine the beta-lactamase variants. *E. coli* C1550 (Rocha-Gracia et al., 2010) was used as a positive control for the *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was used as a positive control for the *bla*<sub>SHV</sub> gene type.

Ceftioxin-resistant isolates were tested for the presence of pAmpC using a multiplex PCR (Pérez-Pérez and Hanson, 2002). Isolates that were positive by PCR with *cit* primers were examined for the presence of *bla*<sub>CMY-2</sub> by PCR and sequencing (Vinué et al., 2008). Mutations in the promoter-attenuator region of the chromosomal *ampC* gene of *E. coli* were studied in ceftioxin and amoxicillin-clavulanic acid resistant *E. coli* isolates by PCR and sequencing. Sequences were compared with the same region of the *E. coli* K12 *ampC* gene to analyse mutations associated with overexpression of the *ampC* gene (Caroff et al., 2000; Vinué et al., 2008).

Genes conferring resistance to other antimicrobial agents were tested by PCR and sequencing: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*; *aac(3)-II*; *tet(A)*, *tet(B)*, *cmIA* and *sul3* (Vinué et al., 2009; Ruiz et al., 2012). The presence of *int11* and *int12* and the variable region structure of integrons were determined by PCR and sequencing (Ruiz et al., 2012).

### Determination of phylogroups and molecular typing of isolates

*E. coli* isolates were categorised into phylogroups (A, B1, B2 or D) by PCR for *chuA*, *yjaA* and the TspE4.C2 DNA fragment (Clermont et al., 2000).

Multilocus sequence typing (MLST) was performed by PCR and sequencing of seven housekeeping genes: *adk* (adenylate kinase), *fumC* (fumarate hydratase), *gyrB* (DNA gyrase), *icd* (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase), *mdh* (malate dehydrogenase), *purA* (adenylosuccinate dehydrogenase) and *recA* (ATP/GTP binding motif) using primers and conditions described by Wirth et al. (2006). According to the allele profile, the isolates were categorised into a specific sequence type (ST) and clonal complex (ST-cplx) using the MLST Database at the University of Warwick.<sup>1</sup> Strains producing ESBL and pAmpC were typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) using *XbaI* (Vinué et al., 2008). PFGE patterns were analysed according to Tenover et al. (1995) against Midrange PFG Marker I and Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs).

## Results

CTX<sup>R</sup> positive *E. coli* isolates were detected in 9/53 (17%) dogs (Table 1). Three of nine CTX<sup>R</sup> positive *E. coli* isolates exhibited an ESBL phenotype, while the remaining 6/9 isolates were negative for ESBL, but resistant to amoxicillin-clavulanic acid and/or ceftioxin, in addition to cefotaxime.

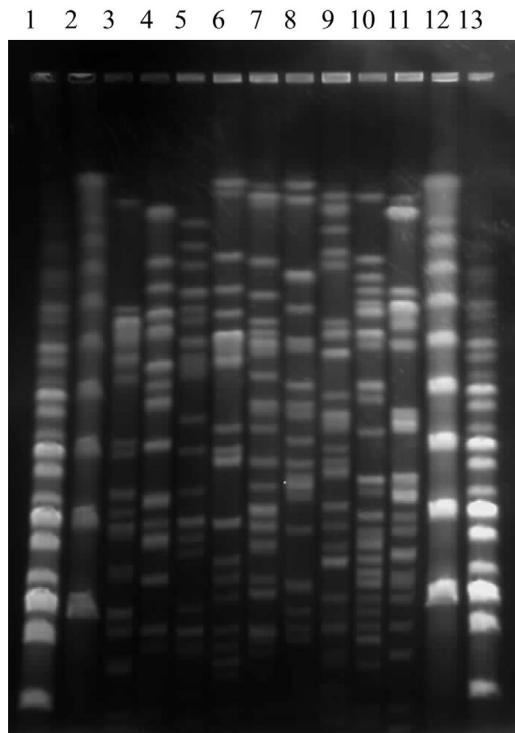
**Table 1** Characteristics of CTX<sup>R</sup> *Escherichia coli* isolates recovered from faecal samples of healthy dogs.

| <i>E. coli</i> strain | Phylogenetic group | MLST (ST/ST-Cplx)      | PFGE pattern | ESBL phenotype | AMC/FOX resistance | Acquired β-lactamases | ampC mutations | Resistance to non-β-lactam agents | Class 1 integron         |                    | Class 2 integron |                          | Other resistance genes                                    |
|-----------------------|--------------------|------------------------|--------------|----------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------|------------------|--------------------------|---|
|                       |                    |                        |              |                |                    |                       |                |                                   | <i>int11/qacEΔ1+sul1</i> | Integron structure | <i>int12</i>     | Integron structure       |   |
| C7205                 | A                  | 617/10                 | A            | +              | +/-                | CTX-M-15              | ND             | Cl, N, A, T, SXT, TE              | +/+                      | drfA17-aadA5       | -                | ND                       | <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>tet(B)</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> |
| C7206                 | A                  | 410/23                 | B            | +              | -/-                | CTX-M-15              | ND             | Cl, N, T                          | -/-                      | ND                 | -                | ND                       | <i>aac(6)-Ib-cr</i>                                       |
| C7207                 | A                  | 3944/None              | C            | +              | -/-                | CTX-M-15              | ND             | Cl, N, G, S, C, SXT, TE           | +/-                      | ND                 | -                | ND                       | <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i>            |
| C7203                 | B1                 | 1431/None              | D            | -              | +/+                | SHV-2                 | -18, -1, +58   | Cl, N, S, C, STX, TE              | +/-                      | ND                 | -                | ND                       | <i>qnrB19</i> , <i>tet(A)</i>                             |
| C7204                 | D                  | 57/none                | E            | -              | +/+                | CMY-2                 | Wild           | Cl, N, G, A, S, T, SXT, TE        | +/+                      | <i>aadA</i>        | +                | <i>dfpA12-sat2-aadA1</i> | <i>tet(B)</i> , <i>cmIA</i> , <i>sul3</i>                 |
| C7209                 | D                  | 4565/None <sup>a</sup> | F            | -              | +/+                | CMY-2                 | -28, +58       | -                                 | -/-                      | ND                 | -                | ND                       | -   |
| C7201                 | D                  | ND                     | G            | -              | +/+                | CMY-2                 | Wild           | Cl, N, G, S, T, C, SXT, TE        | -/+                      | ND                 | -                | ND                       | <i>tet(A)</i> , <i>cmIA</i>                               |
| C7208                 | A                  | 93/168                 | H            | -              | +/+                | CMY-2                 | -32            | Cl, N, G, S, T, C, SXT, TE        | +/+                      | <i>aadB-aadA1</i>  | -                | ND                       | <i>tet(A)</i> , <i>sul3</i>                               |
| C7200                 | A                  | ND                     | I            | -              | +/+                | CMY-2                 | Wild           | S, TE                             | -/-                      | ND                 | -                | -                        | <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i>                             |

MLST, multilocus sequence typing; ST, sequence type; Cplx, complex; ND, not determined; PFGE, pulsed field gel electrophoresis; ESBL, extended spectrum β-lactamase; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; FOX, ceftioxin; A, amikacin; C, chloramphenicol; Cl, ciprofloxacin; G, gentamicin; N, nalidixic acid; S, streptomycin; SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole; T, tobramycin; TE, tetracycline.

<sup>a</sup> Combination of alleles for a new sequence type: *adk* (348), *gyrB* (97), *icd* (29), *mdh* (70), *purA* (158), *recA* (2), and *fumC* (585-new).

<sup>1</sup> See: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/> (accessed 26 June 2014).



**Fig. 1.** Pulsed field gel electrophoresis of *Xba*I-digested genomic DNA from nine extended spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* strains. Lanes 1 and 13, Lambda Ladder PFG Marker; lanes 2 and 12, Mid-range PFG Marker I; lane 3, *E. coli* C7205; lane 4, *E. coli* C7206; lane 5, *E. coli* C7207; lane 6, *E. coli* C7203; lane 7, *E. coli* C7204; lane 8, *E. coli* C7209; lane 9, *E. coli* C7201; lane 10, *E. coli* C7208; lane 11, *E. coli* C7200.

The three ESBL positive isolates contained the gene encoding the  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) and one of these isolates also contained the gene encoding SHV-2 (*bla*<sub>SHV-2</sub>). These three isolates were ascribed to phylogenetic group A and sequence types ST617 (ST-cplx10), ST410 (ST-cplx23) and ST3944 (Table 1); none of the PFGE patterns of these isolates were related (Fig. 1). All three isolates exhibited resistance to fluoroquinolones and to different aminoglycosides, among other antimicrobial agents. Two isolates carried class 1 integrons, one with the *dfrA17-aadA5* array and the other with a non-classical integron lacking the conserved 3'-CS region (*qacEA1* and *sul1* genes). Class 2 integrons were not identified. The CTX-M-15-positive isolates carried the *aac(6)-Ib-cr* or *aac(3)-II* resistance genes (Table 1).

All six ESBL-negative CTX<sup>R</sup> isolates exhibited resistance to ceftiofur and amoxicillin-clavulanic acid, and carried the gene encoding the  $\beta$ -lactamase CMY-2 (*bla*<sub>CMY-2</sub>). These isolates were classified into phylogroups A ( $n = 2$ ), B1 ( $n = 1$ ) and D ( $n = 3$ ); all had unrelated PFGE patterns (Fig. 1). Four isolates typed by MLST showed different sequence types (ST1431, ST57, ST93 and a novel ST) (Table 1). The novel ST was present in *E. coli* strain C7209, which had a novel combination of alleles, generating a new ST (ST4565): *adk* (348), *gyrB* (97), *icd* (29), *mdh* (70), *purA* (158), *recA* (2) and *fumC* (585-new); ST4565 is registered and available in the MLST Database.

On sequencing of the promoter-attenuator region of the chromosomal *ampC* gene in the six CMY-2-positive isolates, three isolates had the wild-type sequence and three isolates had mutations (Table 1). In addition to *bla*<sub>CMY-2</sub>, *E. coli* isolate C7208 carried the -32 point mutation that has been associated with hyperproduction of the AmpC  $\beta$ -lactamase. Two isolates harboured integron structures; one isolate carried a class 1 integron (with the *aadA* array) and a class 2 integron (with the *dfrA12-sat2-aadA1* array), while the other isolate carried a class 1 integron (with the *aadB-aadA1* array).

Different resistance genes were identified among the pAmpC positive isolates, including the *qnrB19* gene in one strain (Table 1).

## Discussion

In this study, we identified ESBL and pAmpC producing *E. coli* isolates in healthy dogs in Mexico, for the first time in Latin America. Previous studies have identified ESBL *E. coli* strains in sick dogs in Chile (Moreno et al., 2008). CMY-2-positive *E. coli* has been reported previously in sick or healthy dogs in the USA and Canada (Sanchez et al., 2002; Murphy et al., 2009; O'Keefe et al., 2010; Shaheen et al., 2011; Bortolaia et al., 2014), as well as in other regions of the world (Jacoby, 2009).

In the present study, 3/53 (5.7%) healthy dogs carried *E. coli* isolates producing ESBLs and 6/53 (11%) dogs carried *E. coli* isolates producing CMY-2 type  $\beta$ -lactamases. Similar percentages of ESBL producing *E. coli* have been found in studies of healthy dogs in Portugal and Italy (Costa et al., 2004; Carattoli et al., 2005). In healthy dogs and cats in Tunisia, 16% carried ESBL producing *E. coli* and 1% carried CMY producing *E. coli* (Sallem et al., 2013). The CMY-2  $\beta$ -lactamase was present in 39% of broad spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolates of faecal origin from healthy dogs in Japan (Okubo et al., 2014). The first ESBL producing *E. coli* to be identified in dogs was recovered from a faecal sample from a laboratory dog in Japan (Matsumoto et al., 1988), followed by dogs with urinary tract infections in Spain (Teshager et al., 2000). Subsequently, ESBL producing *E. coli* have been recovered from sick dogs in many parts of the world, including Portugal (2%), USA (3–7%), Switzerland (7%), Australia (11%), Japan (11%) and China (40%) (Costa et al., 2004; O'Keefe et al., 2010; Sun et al., 2010; Platell et al., 2011; Shaheen et al., 2011; Harada et al., 2012; Huber et al., 2013).

Strains of *E. coli* producing CTX-M-15 are frequently found in humans and appear to be emerging  $\beta$ -lactamase producing strains in veterinary species, including sick dogs and cats (Pomba et al., 2009; Ewers et al., 2010; O'Keefe et al., 2010; Platell et al., 2011; Shaheen et al., 2011; Harada et al., 2012; Huber et al., 2013; Wagner et al., 2014). CTX-M-15 producing *E. coli* have also been sporadically reported in healthy dogs (Albrechtova et al., 2014; Belas et al., 2014). In our study, the gene encoding CTX-M-15 (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) was detected in *E. coli* isolates of phylogroup A and sequence types ST617 (ST-Cplx10), ST410 (ST-Cplx23) and ST3944, but the pandemic clone B2-ST131 was not identified. CTX-M-15 producing *E. coli* isolates of sequence type ST617 have been reported in sick pets in France (Dahmen et al., 2013) and in hospitalised human patients in Tunisia (Sallem et al., 2014). In addition, lineages ST410 and ST10 (ST-Cplx10) have been reported in sick dogs in Switzerland and the UK (Huber et al., 2013; Wagner et al., 2014). To our knowledge, there are no previous reports of CTX-M-15  $\beta$ -lactamase in *E. coli* strains of lineage ST3944.

Resistance conferred by ESBL is often associated with resistance to other classes of antibiotics, such as fluoroquinolones, aminoglycosides and trimethoprim-sulphamethoxazole (Coque et al., 2008), which can be explained in part because plasmids harbouring *bla*<sub>CTX-M</sub> frequently carry genes conferring resistance to other families of antibiotics (Wieler et al., 2011; Ben Sallem et al., 2014).

CMY-type  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* have been detected in 1–39% of healthy dogs in different parts of the world (Carattoli et al., 2005; Wedley et al., 2011; Tamang et al., 2012; Belas et al., 2014; Okubo et al., 2014). Identical ESBL producing strains of *E. coli* have been identified in dogs and their owners, suggesting cross-species transfer of faecal *E. coli* (Albrechtova et al., 2012). Detection of the -32 mutation in the *ampC* chromosomal gene and the simultaneous presence of a CMY-2  $\beta$ -lactamase in one *E. coli* strain of lineage ST93 would explain its ceftiofur and amoxicillin-clavulanic acid resistance phenotype.



In the present study, we identified a high frequency of ESBL/*pAmpC* positive isolates of *E. coli* carrying class 1 or 2 integrons (55%); these included four different gene cassette arrays containing genes for resistance to trimethoprim (*dfrA12*, *dfrA17*) or streptomycin (*aadA1*, *aadA5* and *aadB*). One of these arrays (*aadB-aadA1*) is infrequent in *E. coli* isolates (Kang et al., 2005; Karczmarczyk et al., 2011).

## Conclusions

The presence of CTX-M-15 and CMY-2 producing strains of *E. coli* in healthy dogs is of public health concern because of possible transfer of these antibiotic resistant strains between companion animals and humans. Future studies could focus on risk factors for transmission of  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* between pets and humans in the household environment.

## Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## Acknowledgements

This study was supported by the Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla across the Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos, Subprograma de Aseguramiento de Investigadores Consolidados, by projects: ROGR-NAT12-G, ROGR-NAT13-G and ROGR-NAT14-I. It was also supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México, Ciencia Básica 2012-01 (reference number 178942). Gerardo Cortés C. has a fellowship of CONACYT (number 233611). The work performed at the University of La Rioja was financed by project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Preliminary results were presented as an Abstract at the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 10–13 May 2014.

## References

Albrechtova, K., Dolejska, M., Cizek, A., Tausova, D., Klimes, J., Bebor, L., Literak, I., 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4013–4017.

Albrechtova, K., Kubelova, M., Mazancova, J., Dolejska, M., Literak, I., Cizek, A., 2014. High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola. *Microbial Drug Resistance* 20, 372–375.

Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Canica, M.M., Vedel, G., Névoz, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G., 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like  $\beta$ -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters* 120, 75–80.

Belas, A., Salazar, A.S., Gama, L.T., Couto, N., Pomba, C., 2014. Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in dogs. *Veterinary Record* 175, 202.

Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Jouini, A., Gharsa, H., Klibi, N., Boudabous, A., Torres, C., 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)- and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 1137–1142.

Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Porres-Osante, N., Jouni, A., Klibi, N., Boudabous, A., Sáenz, Y., Torres, C., 2014. *Inc11* plasmids carrying *bla*<sub>CTX-M-1</sub> or *bla*<sub>CMY-2</sub> genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microbial Drug Resistance* 20, 495–500.

Bortolotta, V., Hansen, K.H., Nielsen, C.A., Fritsche, T.R., Guardabassi, L., 2014. High diversity of plasmids harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, 1492–1496.

Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, T.M., 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 1, 144–153.

Carattoli, A., Lovari, S., Franco, A., Cordaro, G., Di Matteo, P., Battisti, A., 2005. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 833–835.

Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H., Reynaud, A., 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing *ampC*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45, 783–788.

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4555–4558.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S21, Vol. 31, no 1.

Coque, T.M., Baquero, F., Cantón, R., 2008. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveillance* 13, 1–11.

Cortés, P., Blanc, V., Mora, A., Dahbi, G., Blanco, J.E., Blanco, M., López, C., Andreu, A., Navarro, F., Alonso, M.P., et al., 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2799–2805.

Costa, D., Poeta, P., Briñas, L., Sáenz, Y., Rodrigues, J., Torres, C., 2004. Detection of CTX-M-1 and TEM-52  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 960–961.

Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology* 8, 26–38.

Dahmen, S., Haenni, M., Châtre, P., Madec, J.Y., 2013. Characterization of *bla*<sub>CTX-M</sub> *IncFII* plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 2797–2801.

Ewers, C., Grobbel, M., Stamm, I., Kopp, P.A., Diehl, I., Semmler, T., Fruth, A., Beutlich, J., Guerra, B., Wieler, L.H., et al., 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 651–660.

Harada, K., Nakai, Y., Kataoka, Y., 2012. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiology and Immunology* 56, 480–485.

Hordijk, J., Schoormans, A., Kwakernaak, M., Duim, B., Broens, E., Dierikx, C., Mevius, D., Wagenaar, J.A., 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum  $\beta$ -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. *Frontiers in Microbiology* 4, 1–5.

Huber, H., Zweifel, C., Wittenbrink, M.M., Stephan, R., 2013. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 162, 992–996.

Jacoby, G.A., 2009. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 161–182.

Kang, S.G., Lee, D.Y., Shin, S.J., Ahn, J.M., Yoo, H.S., 2005. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. *Journal of Veterinary Science* 6, 201–205.

Karczmarczyk, M., Walsh, C., Slowey, R., Leonard, N., Fanning, S., 2011. Molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from Irish cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7121–7127.

Matsumoto, Y., Ikeda, F., Kamimura, T., Yokota, Y., Mine, Y., 1988. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyminocephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 1243–1246.

Moreno, A., Bello, H., Guggiana, D., Domínguez, M., González, G., 2008. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Veterinary Microbiology* 129, 203–208.

Murphy, C., Reid-Smith, R.J., Prescott, J.F., Bonnett, B.N., Poppe, C., Boerlin, P., Weese, J.S., Jancko, N., McEwen, S.A., 2009. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary hospitals in southern Ontario: A preliminary study. *Canadian Veterinary Journal* 50, 1047–1053.

Okubo, T., Sato, T., Yokota, S., Usui, M., Tamura, Y., 2014. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20, 243–249.

O'Keefe, A., Hutton, T.A., Schifferli, D.M., Rankin, S.C., 2010. First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 3489–3492.

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 beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4264–4269.

Pérez-Pérez, F.J., Hanson, N.D., 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2153–2162.

Pitout, J.D., Thomson, K.S., Hanson, N.D., Ehrhardt, A.F., Moland, E.S., Sanders, C.C., 1998.  $\beta$ -Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42, 1350–1354.

Platell, J.L., Cobbold, R.N., Jhonson, J.R., Heisig, A., Heisig, P., Clabots, C., Kuskowski, M.A., Trott, D.J., 2011. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 3782–3787.

- Pomba, C., da Fonseca, J.D., Baptista, B.C., Correia, J.D., Martínez-Martínez, L., 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6′)-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 327–328.
- Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios-Hernández, J.M., Caballero-Torres, P., Torres, C., 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 169–171.
- Ruiz, E., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Rocha-Gracia, R., Martínez-Martínez, L., Arlet, G., Torres, C., 2012. *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 886–897.
- Sallem, R.B., Gharsa, H., Slama, K.B., Rojo-Bezars, B., Estepa, V., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., Sáenz, Y., Boudabous, A., et al., 2013. First detection of CTX-M-1, CMY-2, and QnrB19 resistance mechanisms in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy pets in Tunisia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13, 98–102.
- Sallem, R.B., Slama, K.B., Estepa, V., Cheikhna, E.O., Mohamed, A.M., Chairat, S., Ruiz-Larrea, F., Boudabous, A., Torres, C., 2014. Detection of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. *Journal of Chemotherapy* doi:10.1179/1973947814Y.0000000172.
- Sanchez, S., McCrackin Stevenson, M.A., Hudson, C.R., Maier, M., Buffington, T., Dam, Q., Maurer, J.J., 2002. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3586–3595.
- Shaheen, B.W., Nayak, R., Foley, S.L., Kweon, O., Deck, J., Park, M., Raffi, F., Boothe, D.M., 2011. Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 5666–5675.
- Sun, Y., Zeng, Z., Chen, S., Ma, J., He, L., Liu, Y., Deng, Y., Lei, T., Zhao, J., Liu, J.H., 2010. High prevalence of *bla*<sub>(CTX-M)</sub> extended-spectrum β-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 1475–1481.
- Tamang, M.D., Nam, H.M., Jang, G.C., Kim, S.R., Chae, M.H., Jung, S.C., Byun, J.W., Park, Y.H., Lim, S.K., 2012. Molecular characterization of extended-spectrum-β-lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 2705–2712.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2233–2239.
- Teshager, T., Domínguez, L., Moreno, M.A., Saénz, Y., Torres, C., Cardeñosa, S., 2000. Isolation of an SHV-12 β-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 3483–3484.
- Vinué, L., Lantero, M., Sáenz, Y., Somalo, S., de Diego, I., Pérez, F., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Torres, C., 2008. Characterization of extended-spectrum β-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. *Journal of Medical Microbiology* 57, 916–920.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Martínez, S., Somalo, S., Moreno, M.A., Torres, C., Zarazaga, M., 2009. Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 954–957.
- Wagner, S., Gally, D.L., Argyle, S.A., 2014. Multidrug-resistant *Escherichia coli* from canine urinary tract infections tend to have commensal phylotypes, lower prevalence of virulence determinants and *ampC*-replicons. *Veterinary Microbiology* 169, 171–178.
- Wedley, A.L., Maddox, T.W., Westgarth, C., Coyne, K.P., Pinchbeck, G.L., Williams, N.J., Dawson, S., 2011. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. *Veterinary Record* 168, 354.
- Wieler, L.H., Ewers, C., Guenther, S., Walther, B., Lübke-Becker, A., 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum β-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 635–641.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., et al., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* 60, 1136–1151.

# Detection and Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Producers of Extended-Spectrum and CMY-2 Type Beta-Lactamases, Isolated from Turtles in Mexico

Gerardo Cortés-Cortés,<sup>1</sup> Patricia Lozano-Zarain,<sup>1</sup> Carmen Torres,<sup>2</sup> Miguel Castañeda,<sup>1</sup> Gabriela Moreno Sánchez,<sup>3</sup> Carla A. Alonso,<sup>2</sup> Liliana López-Pliego,<sup>1</sup> María G. Gutiérrez Mayen,<sup>3</sup> Ygnacio Martínez-Laguna,<sup>1</sup> and Rosa del Carmen Rocha-Gracia<sup>1</sup>

## Abstract

Multidrug-resistant bacteria are a growing problem in different environments and hosts, but scarce information exists about their prevalence in reptiles. The aim of this study was to analyze the resistance mechanisms, molecular typing, and plasmid content of cefotaxime-resistant (CTX<sup>R</sup>) *Escherichia coli* isolates recovered from cloacal samples of 71 turtles sheltered in a herpetarium in Mexico. CTX<sup>R</sup>-*E. coli* were recovered in 11 of 71 samples (15.5%), and one isolate/sample was characterized. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* isolates were detected in four samples (5.6%): two strains carried the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene (phylogroup D and ST2732) and two contained the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene (phylogroup B1 and lineages ST58 and ST156). The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was detected by PCR in *E. coli* isolates of eight samples (9.8%) (one of them also carried *bla*<sub>CTX-M-2</sub>); these isolates were distributed into phylogroups A ( $n=1$ ), B1 ( $n=6$ ), and D ( $n=1$ ) and typed as ST155, ST156, ST2329, and ST2732. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes were detected in five isolates [*aac(6')Ib-cr*, *qnrA*, *qnrB19*, and *oqxB*]. From three to five replicon plasmids were detected among the strains, being IncFIB, IncI1, IncF<sub>rep</sub>, and IncK the most prevalent. ESBL or pAmpC genes were transferred by conjugation in four strains, and the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes were localized in IncFIB or IncI1 plasmids by Southern blot hybridization assays. Class 1 and/or class 2 integrons were detected in eight strains with six different structures of gene cassette arrays. Nine pulsed-field gel electrophoresis patterns were found among the 11 studied strains. To our knowledge, this is the first detection of ESBL, CMY-2, PMQR, and mobile determinants of antimicrobial resistance in *E. coli* of turtle origin, highlighting the potential dissemination of multidrug-resistant bacteria from these animals to other environments and hosts, including humans.

**Keywords:** CMY-2, ESBL, *Escherichia coli*, Mexico, multidrug-resistance, turtles

## Introduction

MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIA have increasingly become a serious worldwide concern involving many environments. *Escherichia coli* is one of the most relevant bacteria in this field, because of the symbiotic relationship between this bacterium, humans, and animals and also because of its frequent implication in human and animal infections, acting as an opportunistic pathogen (Croxen and

Finlay 2010). The production and dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases (pAmpC), and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanisms by *E. coli* are often mediated by mobile elements, as plasmids. Moreover, these plasmids frequently harbor genes encoding resistance to other drug classes, such as aminoglycosides, sulfa-derivatives, or trimethoprim, among others, that could be carried in mobilizable genetic elements, as integrons (Ruiz et al. 2012), fact

<sup>1</sup>Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico.

<sup>2</sup>Área Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain.

<sup>3</sup>Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico.



that has significance in the transference into human and veterinary environment. Nowadays, there is information on the presence of multiresistant *E. coli* strains isolated from different origins, such as the hospital environment, food-producing animals and most recently, from wastewater and companion animal hosts (Dierikx et al. 2012, Alouache et al. 2014). Moreover, pets, including reptiles, have been shown to be a source of food-borne pathogens causing infections in humans, as is the case of *Salmonella* (Chen et al. 2010, Whitten et al. 2015) and other *Enterobacteriaceae* (Dierikx et al. 2012). These reservoirs represent a public health concern due to the potential risk of transfer of multidrug-resistant pathogens from pets to their owners through the close contact.

Recently, it has been suggested that antibiotic-resistant bacteria isolated from aquatic animals, as *Chelonia mydas* and *Caretta caretta* sea turtles species, can be used as bioindicators for pollution in the coastal marine habitats, which is considered to be an ecological problem (Foti et al. 2009, Al-Bahry et al. 2012). However, to our knowledge, there does not exist information about the presence of ESBL-, pAmpC-, or PMQR-producing *E. coli* isolated from turtles, or about the potential role of these animals as a source of multidrug resistance bacteria in the household environment. For this reason, and due to the increasing popularity and variety of turtles as pets in recent years, the aim of this study was to identify antimicrobial resistance genes, characterization of integrons and plasmids, as well as the molecular typing of cefotaxime-resistant (CTX<sup>R</sup>) *E. coli* isolated from sheltered turtles in Puebla, Mexico.

## Materials and Methods

### Animals tested

Cloacal swabs were taken in 2012 from all 71 healthy adult turtles sheltered in the herpetarium of the Benemérita Universidad Autónoma of Puebla (Puebla, Mexico). There were 34 female and 37 male turtles of *Kinosternon integrum* ( $n=37$ ), *Trachemys scripta elegans* ( $n=30$ ), *Chelydra serpentina* ( $n=3$ ), and *Rhinoclemmys* spp. ( $n=1$ ) species. The turtles came from environmental habitats ( $n=4$ ) collected by students during camping practices or from household environments, in which turtles were considered as pets and later were donated by their owners ( $n=67$ ). In the herpetarium, they were fed with chicken liver, vegetables, mealworms, and commercial turtle biscuits. The cloacal samples (one per turtle) were transported in Stuart medium to the laboratory and were maintained in refrigeration at 4°C until processing, within a 48-h period.

### Isolation of *E. coli* strains

The samples were inoculated on Levine agar plates supplemented with cefotaxime (2 µg/mL) for CTX<sup>R</sup> *E. coli* recovery. CTX<sup>R</sup> bacteria with features corresponding to *E. coli* were randomly selected (up to three per sample) and identified by standard biochemical tests (Gram staining, lactose fermentation, indol production, and methyl red/Voges-Proskauer test) and by the species-specific PCR for *uidA* (beta-glucuronidase enzyme) gene detection (Ben Sallem et al. 2014).

### Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing was performed by the disk diffusion method, and the susceptibility was interpreted according to

the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013), for ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cefalotin, cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, nalidixic acid, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, tobramycin, streptomycin, chloramphenicol, trimethoprim, trimethoprim/sulfamethoxazole, and tetracycline. *E. coli* ATCC 25922 was used as a control strain.

The screening of phenotypic ESBL production was performed with the standard double-disk synergy test, using disks of cefotaxime (30 µg), ceftazidime (30 µg), aztreonam (30 µg), and cefepime (30 µg), with a centrally positioned disk of amoxicillin/clavulanate (20/10 µg) at a center-to-center distance of 25–30 mm. The presence of clear-cut extension of the edge of β-lactamic inhibition zone toward the disk containing β-lactamase inhibitor was considered as a positive test for ESBL.

### Characterization of antimicrobial resistance genes and integrons

β-lactamase (*bla*<sub>CTX-M</sub> groups 1, 2, 8, and 9, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>TEM</sub>) and PMQR encoding genes [*qnrA*, *qnrB*, *aac(6′)-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA*, and *oqxB*], as well as aminoglycoside [*aac(3)-II*, *aadA1/2*], sulfonamide (*sul1*, *sul3*), chloramphenicol (*cmlA*), trimethoprim (*dhfrA*), and tetracycline [*tet(A)*, *tet(B)*] resistance genes were tested by PCR and sequencing in all the recovered CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates (Vinué et al. 2009, Ruiz et al. 2012).

The presence of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes was tested by using a multiplex PCR (Pérez-Pérez and Hanson 2002). Mutations in the regulatory region of *ampC* chromosomal gene were determined by PCR and sequencing, as well as the mutations in the *gyrA* and *parC* genes in the quinolone-resistant isolates (Ruiz et al. 2012). The presence of *int11* and *int12* genes was tested by PCR and their variable region structures were determined by PCR and sequencing following the primer walking strategy (Sáenz et al. 2010).

### Phylogenetic grouping

*E. coli* isolates were classified in the phylogenetic groups according to the Clermont phylotyping method, which is based on a PCR assay to detect the genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, and the DNA fragment TspE4.C2 (Clermont et al. 2013).

### Multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis typing

The molecular typing of selected strains was carried out by multilocus sequence typing (MLST) analysis, sequencing internal fragments of seven standard housekeeping genes (*adh*, *fumC*, *icd*, *purA*, *gyrB*, *recA*, and *mdh*), and getting the allele combination at <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/> website (MLST Databases at UoW, 2016). The sequence type (ST) and clonal complex (ST Cplx) of isolates were identified.

All the strains were also typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *XbaI* (Vinué et al. 2008), PFGE patterns were classified by the cluster analysis of Dice similarity index (value >85%) to assign a pulsotype (PT), and a dendrogram was also generated by Dice/Unweighted Pair

Group Method using arithmetic averages (UPGMA) analysis using the NTSYSpc 2.21q software.

**Conjugation assays**

Conjugation experiments were carried out to determine the transferability of ESBL and pAmpC encoding genes in nine selected donor strains (based on PFGE patterns and genotypic resistance determinants), using the rifampicin-resistant (RIF<sup>R</sup>) *E. coli* C600, RIF<sup>R</sup> *E. coli* J53, or azide-resistant (AZ<sup>R</sup>) *E. coli* J53 as recipient strains. Transconjugants were selected in MacConkey agar plates supplemented with rifampicin (100 µg/mL) or azide (100 µg/mL) and cefotaxime (2.5 µg/mL). Transconjugants were tested for resistance to antimicrobial agents, phenotypic ESBL production, and PCR for detection of ESBL, pAmpC, and other resistance genes, as described above.

**Plasmid characterization**

Plasmids were classified according to their incompatibility group using the PCR-based replicon typing method, which comprises the major plasmid incompatibility groups among *Enterobacteriaceae* (Carattoli et al. 2005). PFGE with S1 nuclease (S1 Nuclease Fermentas Thermo Scientific) digestion of whole genomic DNA was performed for all 11 donor strains and transconjugants to determine the plasmid content and size (Ben Sallem et al. 2014), compared with MidRange I PFG Marker (New England Biolabs). The plasmid-containing reference strain NCTC 50192 was used as a control strain (Philippon et al. 1997), and the plasmid sizes (PSs) were estimated using statistical analysis. A simple linear regression analysis through the least squares method was performed to determine the PSs, using the Statgraphics software (Statgraphics 2010) for data processing. This software designed a calculation model that approximated the expected PS as a function of the experimental data of migration distance, compared with the size marker (Midrange PFG Marker) migration in the S1-PFGE gel. The resulting linear regression equation was  $PS = (23.1383 - 0.245662 \times DM)^2$  with  $r^2 = 99.96$ , which explains the variability of molecular size as a function of the migration distance with a 95% confidence interval (absolute error = 0.05).

**Hybridization analysis**

To test the plasmid localization of transferred resistance determinants, hybridization experiments with radioactive labeling were carried out in plasmid DNA of donor and transconjugant strains. Southern blots were performed from resolved plasmids obtained by the S1-PFGE procedure, which were transferred to nylon membranes (Hybond-N; GE Healthcare Lifescience) with a 0.4 M NaOH solution. Pre-hybridizations were assayed at 42°C for 4 h with the pre-hybridization solution (Formamide, 20×SSC, 100×Denhardts, 0.25 M EDTA pH8, 1.0 M Tris pH 7.5, sodium dodecyl sulfate [SDS] 10%, calf thymus DNA, H<sub>2</sub>O). Hybridization using <sup>32</sup>P labeling and detection kit (RadPrime DNA Labeling System; Thermo Fisher Scientific) was performed with PCR-generated probes specific for *bla*<sub>CMY-2</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> resistance genes as well as for the IncFIB and IncII replicons, at 42°C for 18 h with subsequent washings, as recommended by the manufacturer. Purified PCR products were used as

TABLE 1. MOLECULAR TYPING, ACQUIRED BETA-LACTAMASES, PLASMID TYPING, AND RESISTANCE DETERMINANTS LOCATION OF CTX<sup>R</sup> ESCHERICHIA COLI ISOLATES RECOVERED FROM TURTLES

| <i>E. coli</i> strain | Turtle species ( <i>sex/origin</i> ) <sup>a</sup> | Phylogenetic group | PFGE pulsotype | MLST            |                | ESBL/pAmpC detected           | Plasmid characterization          |                               |
|-----------------------|---|--------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
|                       |   |                    |                | ST              | ST complex     |                               | Replicon typing                   | Number: size (kb)             |
| C7210                 | <i>Kinosternon integrum</i> (M/P)                 | D                  | PT1            | 2732            | — <sup>b</sup> | CTX-M-2                       | II, FIB, FIC, Frep                | 3: 45, 85, 170                |
| C7212                 | <i>K. integrum</i> (F/P)                          | D                  | PT2            | 2732            | —              | CTX-M-2/CMY-2                 | II, FIB, FIC, Frep                | 4: 85, 120, 165, 220          |
| C7221                 | <i>Trachemys scripta elegans</i> (F/P)            | B1                 | PT4            | 58              | 155            | CTX-M-15 <sup>c</sup>         | FIB <sup>e</sup> , Y, Frep, K     | 3: 65, 120 <sup>c</sup> , 145 |
| C7215                 | <i>K. integrum</i> (M/P)                          | B1                 | PT7            | 156             | 156            | CTX-M-15 <sup>c</sup> , TEM-1 | II, FIB, Frep, K                  | 2: 100, 135 <sup>c</sup>      |
| C7222                 | <i>K. integrum</i> (F/P)                          | B1                 | PT3            | 156             | 156            | CMY-2 <sup>d</sup>            | I1 <sup>d</sup> , FIB, Frep, K    | 3: 85 <sup>d</sup> , 145, 190 |
| C7211                 | <i>K. integrum</i> (F/P)                          | B1                 | PT8            | 2329            | —              | CMY-2                         | II, N, FIB, Frep, K               | 2: 90, 130                    |
| C7214                 | <i>K. integrum</i> (F/P)                          | B1                 | PT8            | 2329            | —              | CMY-2 <sup>d</sup>            | II, N, FIB <sup>d</sup> , Frep, K | 2: 90 <sup>d</sup> , 130      |
| C7218                 | <i>T. scripta elegans</i> (F/P)                   | B1                 | PT9            | 155             | 155            | CMY-2 <sup>d</sup>            | FIB, P, Frep, K, B/O              | 2: 100, 125 <sup>d</sup>      |
| C7220                 | <i>T. scripta elegans</i> (M/P)                   | B1                 | PT9            | 155             | 155            | CMY-2 <sup>d</sup>            | FIB, P, Frep, K, B/O              | 2: 100, 125 <sup>d</sup>      |
| C7219                 | <i>Chelydra serpentina</i> (M/E)                  | B1                 | PT6            | ND <sup>e</sup> | ND             | CMY-2 <sup>d</sup>            | FIB <sup>d</sup> , Frep, K        | 3: 70, 90 <sup>d</sup> , 195  |
| C7216                 | <i>K. integrum</i> (M/P)                          | A                  | PT5            | ND              | ND             | CMY-2 <sup>d</sup>            | FIB, II, Frep, K                  | 2: 70, 95 <sup>d</sup>        |

Conjugative strains as well as beta-lactamases and plasmids transferred by conjugation are indicated in *bold letters*. Beta-lactamases and associated plasmids detected by Southern blot hybridization are indicated in *underlined letters*.

<sup>a</sup>Sex: F, female; M, male; Origin previous to herpetarium shelter: P, pet; E, environment.

<sup>b</sup>No ST complex assigned.

<sup>c</sup>*bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene and the type of plasmid where it was localized by Southern blot hybridization.

<sup>d</sup>*bla*<sub>CMY-2</sub> gene and the type of plasmid where it was localized by Southern blot hybridization.

<sup>e</sup>ND, non determined.

ESBL, extended-spectrum β-lactamases; MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; ST, sequence type.

hybridization controls and *E. coli* C600 and *E. coli* J53 (plasmid-free strains) as negative controls (Supplementary Fig. S1; Supplementary Data are available online at [www.liebertpub.com/vbz](http://www.liebertpub.com/vbz)). Finally, the membranes were exposed on a photographic film (Kodak X-Omat LS film) at 4°C by 48 h and treated with developer and fixer solutions (Carestream).

## Results

### *E. coli* isolates identified

CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates were detected in 11 of 71 cloacal samples analyzed (15.5%), which corresponded to 10 pet turtles and one environmental habitat turtle. Three CTX<sup>R</sup> isolates were initially selected from each positive sample, however, after bacterial identification, susceptibility testing, and assays of PCRs for the identification of  $\beta$ -lactamase genes, some isolates looked similar; for this reason, only one isolate per sample was maintained and further studied, doing a collection of 11 CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates.

### Detection of ESBL-positive *E. coli* isolates and clonality

Four of 11 CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates showed a positive ESBL screening test, which were recovered from two females and two males of two different turtle species (Table 1). The gene encoding CTX-M-2 enzyme was identified in two of them and the gene of CTX-M-15 in the other two isolates (Table 1).

The CTX<sup>R</sup> *E. coli* strains were classified in nine different PT by the cluster analysis of Dice similarity index (value >85%) (Fig. 1). Two groups of CMY-2-producing isolates (PT8 and PT9) showed a 100% Dice coefficient of clonal identity, as well as the same ST2329 and ST155, respectively (Fig. 1).

### Detection of acquired pAmpC $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* isolates

Eight of the 11 CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates showed resistance to amoxicillin-clavulanic acid and/or ceftiofur and 7 of them exhibited a negative ESBL screening test. The CMY-2  $\beta$ -lactamase was identified by PCR and sequencing in all these eight isolates (one of them also carried the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene showing a positive ESBL screening test) (Table 1). The

*bla*<sub>CMY-2</sub> gene was flanked by the *ISEcp1* and *tnpA* in upstream and by the *blc* gene in downstream regions, as determined by PCR and sequencing of flanking regions.

The CMY-2-positive *E. coli* isolates showed a high genetic diversity with six different PFGE PTs; these isolates were ascribed to the phylogroups B1 ( $n=6$ ), A ( $n=1$ ), and D ( $n=1$ ), and to the sequence types ST155, ST156, ST2329, and ST2732. Different mutations in the *ampC*-regulatory region were identified in six CMY-2-positive isolates (-18, -1, +58 in all these isolates, with an additional change in +54 in two of them) (Table 2).

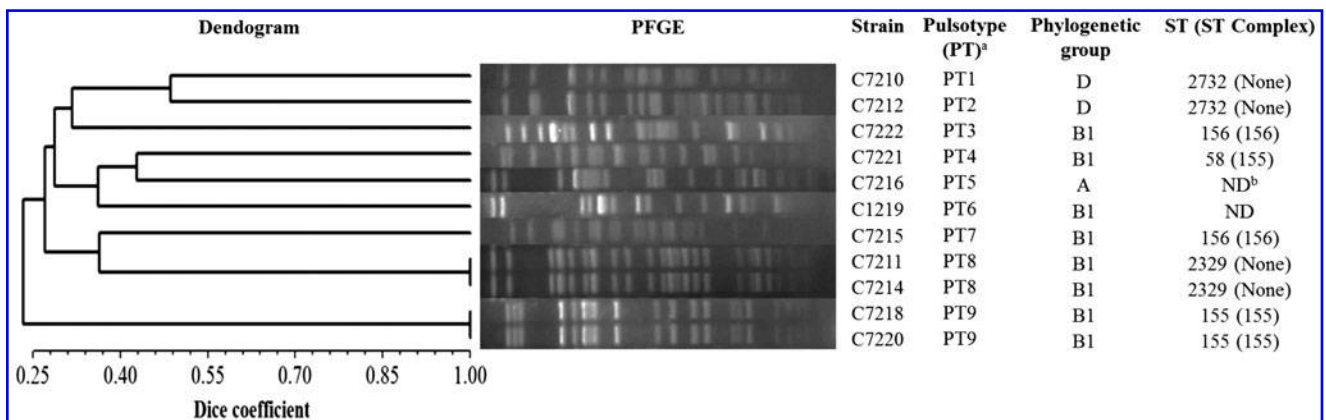
### Antimicrobial resistance genes and integrons

Table 2 shows the resistance genes detected in the 11 CTX<sup>R</sup> *E. coli* isolates. Five strains carried plasmid-mediated quinolone resistance genes, detected by PCR and sequencing [*qnrA*, *qnrB19*, *aac(6')**Ib-cr*, and *oqxB*]. The CMY-2-positive *E. coli* strain C7222 harbored the three genes *qnrB19*, *aac(6')**Ib-cr*, and *oqxB*. The tetracycline resistance *tet(A)* and/or *tet(B)* genes were detected in 10 of 11 ESBL/pAmpC-*E. coli* isolates (except in strain C7212). At least three amino acid changes were identified in GyrA (two changes at positions 83 and 87) and ParC (from one to two changes at positions 80 and 84) of the five ciprofloxacin-resistant *E. coli* strains (Table 2).

Class 1 and 2 integrons were characterized by the primer walking strategy and sequencing. The *intI1* gene was detected in 9 of 11 ESBL/pAmpC isolates, and five different gene cassette arrays were identified (Fig. 2, Table 2). Four of these arrays corresponded to nonclassical integrons lacking the conserved 3'-CS region (*qacEΔ1* and *sul1* genes), most of them linked to *sul3* gene. The fifth gene cassette array corresponded to a classical class 1 integron with the 3'-CS region, and the array *dfrA1-aadA1*. Four *E. coli* strains showed a positive PCR for *intI2* gene, and the array *dfrA1-sat2-aadA1* was identified in two of them (corresponding to CTX-M-2-positive isolates) (Fig. 2, Table 2).

### Gene transfer assays and plasmid analysis

At least three different replicons were identified by PCR in the 11 ESBL/pAmpC-*E. coli* isolates of the study, being



**FIG. 1.** UPGMA dendrogram, PFGE of *XbaI*-digested genomic DNA patterns, and molecular typing from the 11 ESBL and CMY-2-producing *Escherichia coli* strains of turtle origin. <sup>a</sup>Classification based on the cluster analysis of Dice similarity index (value >85%). <sup>b</sup>Non determined. ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; UPGMA, Unweighted Pair Group Method using arithmetic averages.

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF ESBL/pAMPc-PRODUCING *E. coli* ISOLATES IN RELATION TO INTEGRONS AND RESISTANCE MECHANISMS

| <i>E. coli</i> strain | Resistance to non-β-lactam agents <sup>a</sup> | Resistance genes to non-β-lactam agents <sup>b</sup>             | Class 1 integron                |  | Class 2 integron |  | Mutations in chromosomal ampC gene |            | Amino acid changes |      |
|-----------------------|--|--|---------------------------------|--|------------------|--|------------------------------------|------------|--------------------|------|
|                       |  |  | <i>int1/qacE</i> Δ1+ <i>su1</i> | Gene cassette array structure <sup>c</sup> | <i>int12</i>     | Gene cassette array structure <sup>c</sup> |                                    |            | GyrA               | ParC |
| C7210                 | NA, CI, G, S, C, TM, SXT, TE                   | <i>qnrA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(A)</i> , <i>su13</i>     | +/+                             | A  | +                | F  | ND <sup>d</sup>                    | S83L, D87N | S80I               |      |
| C7212                 | NA, CI, G, T, S, C, TM, SXT, TE                | <i>aac(3)-II</i> , <i>su13</i>                                   | +/+                             | A  | +                | F  | Wild                               | S83L, D87N | S80I               |      |
| C7221                 | C, TM, SXT, TE                                 | <i>tet(A)</i> , <i>su13</i>                                      | +/-                             | ni <sup>e</sup>                            | -                | -  | ND                                 | ND         | ND                 |      |
| C7215                 | NA, CI, G, T, S, C, TM, SXT, TE                | <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(B)</i> , <i>cmIA</i>                   | +/+                             | B  | -                | -  | ND                                 | S83L, D87N | S80I, E84A         |      |
| C7222                 | NA, CI, S, C, TMP, SXT, TE                     | <i>qnrB19</i> , <i>OqxB</i> , <i>aac(6)Ib-cr</i> , <i>tet(A)</i> | +/+                             | C  | -                | -  | -18, -1, +58                       | S83L, D87H | S80I               |      |
| C7211                 | NA, S, TE                                      | <i>qnrB19</i> , <i>tet(A)</i>                                    | +/+                             | ni <sup>e</sup>                            | -                | -  | -18, -1, +54, +58                  | ND         | ND                 |      |
| C7214                 | S, TM, SXT, TE                                 | <i>qnrB19</i> , <i>tet(A)</i>                                    | +/+                             | ni <sup>e</sup>                            | -                | -  | -18, -1, +54, +58                  | ND         | ND                 |      |
| C7218                 | S, C, TM, SXT, TE                              | <i>tet(A)</i>  | -/-                             | -  | +                | ni <sup>e</sup>                            | -18, -1, +58                       | ND         | ND                 |      |
| C7220                 | S, C, TM, SXT, TE                              | <i>tet(A)</i>  | -/-                             | -  | +                | ni <sup>e</sup>                            | -18, -1, +58                       | ND         | ND                 |      |
| C7219                 | NA, CI, G, S, TM, SXT, TE                      | <i>qnrA</i> , <i>aac(3)-II</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i>   | +/+                             | D  | -                | -  | -18, -1, +58                       | S83L, D87N | S80I               |      |
| C7216                 | C, TM, SXT, TE                                 | <i>tet(A)</i>  | +/+                             | E  | -                | -  | -18, -1, +58                       | ND         | ND                 |      |

<sup>a</sup>NA, nalidixic acid; CI, ciprofloxacin; G, gentamicin; T, tobramycin; S, streptomycin; C, chloramphenicol; TM, trimethoprim; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TE, tetracycline. The breakpoints for the antimicrobial agents were compared with CLSI (2013).

<sup>b</sup>Resistance determinants transferred by conjugation to the *E. coli* recipient strains C600 or J53 are indicated in bold letters.

<sup>c</sup>These structures correspond to those represented in Figure 2.

<sup>d</sup>ND, non determined.

<sup>e</sup>ni, non identified array with performed PCRs.

IncF<sub>rep</sub>, IncFIB, IncK, and IncI1 the most prevalent replicon plasmids detected (Table 1). The *E. coli* isolates carried from two to four plasmids ranging in sizes from 45 to 220 kb, determined by S1-PFGE strategy (Fig. 3).

Conjugation experiments were performed in 9 of the 11 ESBL/pAmpC producing *E. coli* strains, which presented unrelated PFGE patterns. Transconjugants were obtained from four of these nine isolates with two recipient strains: (1) strain C7221 (recipient *E. coli* C600); (2) strains C7214, C7219, and C7222 (recipient RIF<sup>R</sup> J53 *E. coli*).

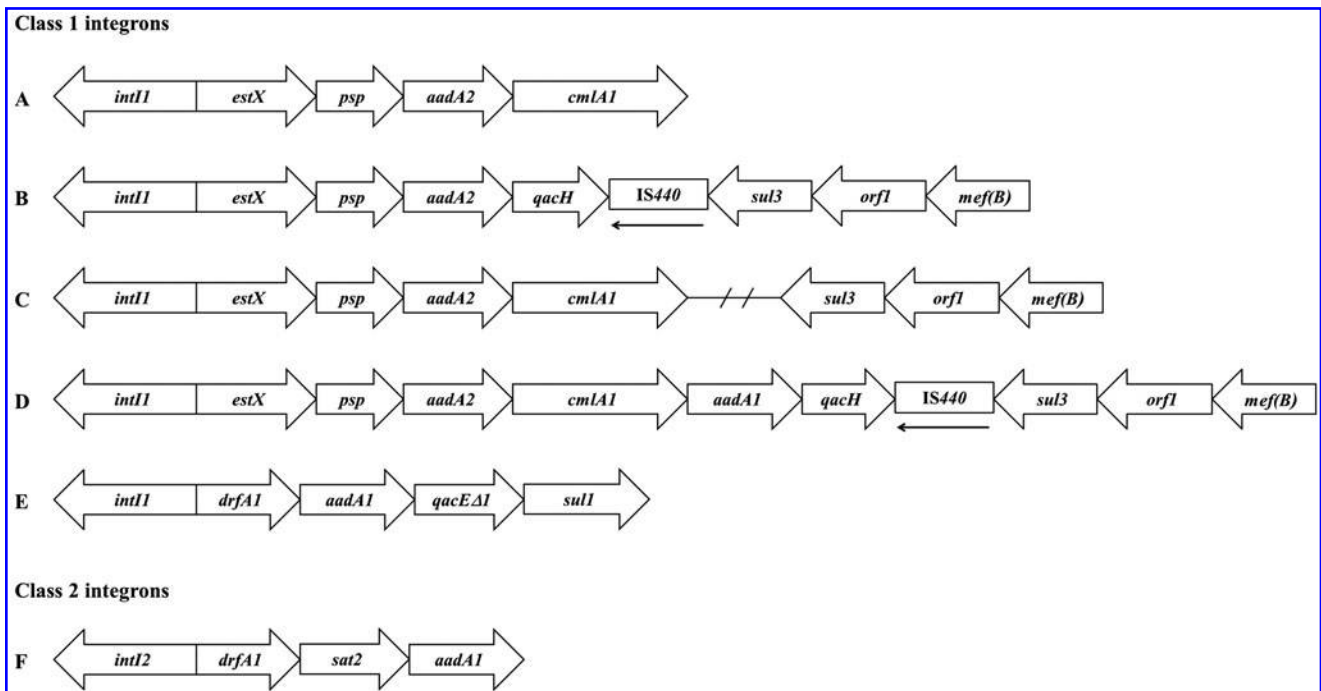
The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was localized by hybridization in an IncFIB plasmid of 120 kb in the conjugative strain C7221 (Table 1), as well as in its transconjugant (Table 1 and see Supplementary Figs. S1 and S2). This ESBL gene was also detected in a plasmid of 135 kb in the nonconjugative strain C7215 (Table 1 and Supplementary Fig. S2). In contrast, the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was detected in IncI1 plasmids of 85 kb (conjugative strain 7222) or 95 kb (strain C7216), as well as in an IncFIB plasmid of 90 kb in the conjugative strains C7214 and C7219 (Table 1 and Supplementary Figs. S1 and S2). Moreover, the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene of the strains C7218 and C7220 was localized in a 125 kb plasmid, although it could not be determined its specific replicon type; both strains presented the same sequence type (ST155) and PFGE pattern (PT9) and were recovered from two turtles of the same species (*T. scripta elegans*). During the conjugative experiments, cotransference of *qnrA* and *bla*<sub>CMY-2</sub> genes was evidenced in C7219 strain (Tables 1 and 2).

**Discussion**

Beta-lactamases of the ESBL or pAmpC types are frequently detected in *E. coli* isolates worldwide, being the CTX-M-15- and the CMY-2-type enzymes the most prevalent in human isolates (Cantón et al. 2012); these enzymes inactivate third generation cephalosporins, and they can mediate resistance to carbapenems, when combining with other resistance mechanisms (Bortolaia et al. 2014).

The high frequency of detection of ESBL- and especially of pAmpC-producing *E. coli* strains among the studied turtles (15.5%) is of special relevance. Although our *E. coli* isolates presented a high diversity of PFGE patterns (nine different PTs) and STs (five different ones), a partial clonal dissemination could not be discarded, due to the fact that some of the animals carried *E. coli* isolates with identical or related PFGE patterns (C7211/C7214, C7218/C7220, and C7210/C7212) (Fig. 1), which could contribute, in part, to the high prevalence detected. Nevertheless, the dissemination of plasmids among different *E. coli* clones of the intestinal tract of these turtles is a plausible possibility (Chen et al. 2010).

The origin of these ESBL/pAmpC-producing *E. coli* isolates might be related to the food used for these animals (chicken liver, vegetables, mealworms, or commercial turtle biscuits), since ESBL- and AmpC-producing *E. coli* have been extensively reported in food-producing animals, especially in chickens (Ferreira et al. 2014). Nevertheless, we cannot exclude the potential acquisition of these multidrug-resistant bacteria during the preherpetarium period (either in-house as pets or in wildlife in the environment), mostly if we consider that most of the studied turtles came from the



**FIG. 2.** Structures of gene cassette arrays detected in class 1 (A–E) and class 2 (F) integrons in the studied ESBL- and CMY-2-producing *E. coli* strains from turtles.

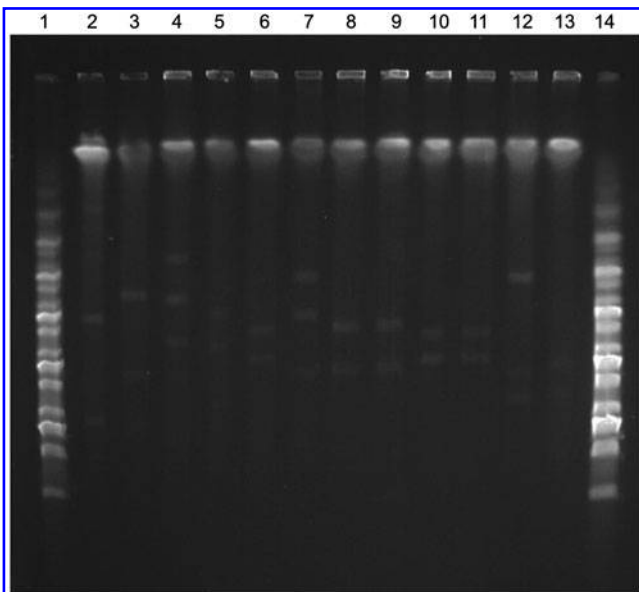
household environment before they were sheltered in the herpetarium.

The ESBL types detected in turtles, CTX-M-2 and CTX-M-15, correspond to variants frequently reported among clinical *E. coli* isolates in Latin America (García-Fulgueiras et al. 2011, Sennati et al. 2012, Redondo et al. 2013) and

Mexico (Rocha-Gracia et al. 2010, Silva-Sánchez et al. 2013), respectively.

The CTX-M-15 variant was detected in isolates of lineages ST58 and ST156, as previously reported in *E. coli* isolates from humans and animals in The Netherlands and Chile (Dierikx et al. 2012, Hernandez et al. 2013); however, the lineage ST2732 associated to CTX-M-2  $\beta$ -lactamase as in this study, has not been previously reported. Moreover, the pandemic clone B2-ST131 was not found in our collection of strains.

It is of relevance the high frequency of CMY-2-producing isolates among the studied healthy animals (8 of 71, 11.3%). CMY-2 is the most common pAmpC  $\beta$ -lactamase worldwide disseminated in clinical isolates (Jacoby 2009). Moreover, the CMY-2 variant has been detected in *Salmonella* isolates from humans and *E. coli* isolates from healthy dogs in Mexico (Wiesner et al. 2013, Zaidi et al. 2013, Rocha-Gracia et al. 2015) and in South America (Cejas et al. 2014). It is noteworthy that *Salmonella* is associated with colonization in reptiles (Chen et al. 2010, Whitten et al. 2015), as turtles (Díaz et al. 2006, Liu et al. 2013); for this reason, a possible transference of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene between *Salmonella* and *E. coli* isolates could not be discarded. It has been previously demonstrated the transference of common plasmids carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> gene between animal-associated *Salmonella* and *E. coli* isolates, and the presence of these plasmids also in human isolates. All these facts suggest that plasmid-mediated CMY-2  $\beta$ -lactamase has undergone transference between different bacterial species and hosts (Winokur et al. 2001), causing a serious concern of public health due to the growing popularity of animal reservoirs as pets and the close contact with humans. The presence of CMY-2 *E. coli* producers isolated from turtles that were used as pets represents an evolutionary advantage for the spread of  $\beta$ -lactam resistance determinants as a consequence of the high use of  $\beta$ -lactam



**FIG. 3.** PFGE of Nuclease S1-digested DNA to determine the number and size of plasmids from the 11 ESBL or CMY-2-producing *E. coli* strains of turtle origin. 1 and 14, MidRange I PFG Marker (New England Biolabs®); 2, plasmid-containing reference strain NCTC 50192 (showing approximated plasmids of 154, 66, and 48 kb); 3, C7210, 4, C7212; 5, C7221; 6, C7215; 7, C7222; 8, C7211; 9, C7214; 10, C7218; 11, C7220; 12, C7219; 13, C7216.

antibiotics in both human and veterinary medicine (Bortolaia et al. 2014).

It is interesting that the phylogroup B1, which has been associated with commensal and environmental isolates, was the most frequently identified among *E. coli* isolate producers of resistance enzymes as CTX-M-15 or CMY-2  $\beta$ -lactamases. On the other hand, the CTX-M-2 *E. coli* producers belonged to the phylogroup D, which has been associated to extra-intestinal pathogenic strains, with more virulence factors than commensal *E. coli* isolates of phylogroups A or B1 (Carlos et al. 2010).

The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene has been associated with Inc11, IncA/C, IncFII, IncI2, IncL/M, and IncB/O plasmids in *E. coli* isolates from humans, companion and food animals (Bortolaia et al. 2014, Guo et al. 2014). Our strains contained different replicons as is the case of IncFIB, Inc11, IncF<sub>rep</sub>, and IncK as the most prevalent ones (Table 1), and the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was detected in Inc11 or IncFIB plasmids of 85–95 kb in four of them (in two of these strains the ESBL encoding plasmid was transferred by conjugation). The size of the plasmids carrying the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene (125 kb) was detected in two of the strains, but not the plasmid replicon type. The *bla*<sub>CMY-2</sub> gene was also cotransferred with *qnrA* gene in C7219 strain, but neither gene was localized in the 195 kb IncFIB plasmid detected by hybridization in the donor strain. The plasmid characterization suggests a high diversity of conjugative and nonconjugative plasmids harboring the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene among turtle *E. coli* isolates in this study. The possible exchange of plasmids harboring *bla*<sub>CMY-2</sub> between humans and animals is mostly focused to studies examining bacterial isolates from human, food-producing animals, and food (Winokur et al. 2001, Guo et al. 2014), and the spread of this  $\beta$ -lactam resistance determinant from pets has received less attention to date. In this study, the genetic diversity observed in plasmids encoding CMY-2 represents an evolutionary advantage that could facilitate spread of this  $\beta$ -lactam resistance determinant, with implications in both human and veterinary medicine.

In addition, a variety of genetic elements have been implicated in the mobilization of pAmpC encoding genes, like the insertion sequence *ISEcp1*, associated with *bla*<sub>CMY-2</sub>, which is able to mobilize and supply an efficient promoter for the high-level expression of neighboring genes, like the chromosomal *bla* gene onto plasmids (Jacoby 2009). The *ISEcp1* element was found in the genetic environment of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in pAmpC-producing *E. coli* isolates of our study.

The global spread of CTX-M-15 ESBL type is mainly associated with incompatibility group F plasmids, although IncN, Inc11, and IncL/M plasmids are also involved (Cantón et al. 2012); we detected an IncFIB plasmid of 120 kb carrying the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene in a conjugative strain and in its transconjugant. The *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene was also in a non-conjugative plasmid of 135 kb that did not hybridize with IncFIB or Inc11 probes; we cannot discard that this plasmid corresponded to IncK type, but specific hybridization was not performed.

The studied animals contained fluoroquinolone-resistant *E. coli* isolates (7%), with PMQR genes associated. The presence of *oqxB* gene is very unusual in *E. coli*, although it has been previously reported from isolates of swine manure source in Denmark (Hansen et al. 2004), farm animals, farm workers and the environment in China (Zhao et al. 2010), as well as in a clinical *E. coli* isolate in Spain (Ruiz et al. 2012), among

other sources. This efflux pump encoding gene (commonly found as a chromosomal gene in *Klebsiella pneumoniae*), which is associated with a reduction in fluoroquinolone susceptibility, was found coassociated with other PMQR genes in a CMY-2-producing *E. coli* strain of lineage ST156 and different plasmid replicons, fact that could explain the extended genetic quinolone-resistant background.

Furthermore, the presence of sulfonamide, chloramphenicol, and trimethoprim resistance genes was detected in class 1 or class 2 integrons (most in arrays associated to non-classical integrons) as previously reported (Sáenz et al. 2010). This mechanism could be implicated in the dissemination of resistance determinants among these ESBL/pAmpC-producing *E. coli* isolated from turtles.

## Conclusions

To our knowledge, this is the first report of ESBL, plasmid-encoded AmpC  $\beta$ -lactamases, PMQR genes and mobile determinants of antimicrobial resistance in *E. coli* of turtle origin. The presence of both CTX-M 15 (global epidemic variant) and CTX-M-2 (more associated to the American continent)  $\beta$ -lactamases as well as the plasmid-encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase is of interest because healthy turtles may be a source of *E. coli* producing these enzymes and could participate in the dissemination of multidrug-resistant bacteria to other environments and hosts. Future studies are necessary to determine the mutual dissemination of multidrug-resistant bacteria between turtles used as pets and humans, upon clinical, veterinary, and ecological environments; this fact is of relevance considering that nowadays turtles have become very popular pets that have direct contact with humans, especially with children, highlighting the role of turtles as a possible close source of multidrug-resistant bacteria.

## Acknowledgments

The authors thank Escuela de Biología de Benemérita Universidad Autónoma de Puebla for access of animals included in this study. This study was approved and supported by the Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla across the Programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos, Sub-programa de Aseguramiento de Investigadores Consolidados, convocatorias 2012, 2013 y 2014. Also, it was supported for CONACYT-México, across the summons of Ciencia Básica 2012-01, with number of reference 178942. G.C.C. has a fellowship of CONACYT with number 233611 and C.A.A. has a predoctoral FPI fellowship of the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (BES-2013-063105). The work performed in University of La Rioja was financed by project SAF2012-35474 from the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). The authors thank Eduardo Miguel Brambila Colombres for the use of his laboratory for hybridization experiments. Part of these results has been presented at the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 10th–13th May, 2014.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.



## References

- Al-Bahry SN, Al-Zadjali MA, Mahmoud IY, Elshafie AE. Biomonitoring marine habitats in reference to antibiotic resistant bacteria and ampicillin resistance determinants from oviductal fluid of the nesting green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Chemosphere* 2012; 87:1308–1315.
- Alouache S, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, et al. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist* 2014; 20: 30–38.
- Ben Sallem R, Ben Slama K, Rojo-Bezares B, Porres-Osante N, et al. IncI1 plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) or *bla*(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist* 2014; 20:495–500.
- Bortolaia V, Hansen KH, Nielsen CA, Fritsche TR, et al. High diversity of plasmids harbouring *bla*<sub>CMY-2</sub> among clinical *Escherichia coli* isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1492–1496.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3:1–19.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63:219–228.
- Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* 2010; 10:161.
- Cejas D, Vignoli R, Quinteros M, Marino R, et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. *Rev Argent Microbiol* 2014; 46:30–33.
- Chen CY, Chen WC, Chin SC, Lai YH, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonellae* isolates from reptiles in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 2010; 22:44–50.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 2013; 5:58–65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI document M100-S23, 2013; 33: No. 1.
- Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:26–38.
- Díaz MA, Cooper RK, Cloeckaert A, Siebeling RJ. Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:306–312.
- Dierikx CM, van Duijkeren E, Schoormans AH, van Essen-Zandbergen A, et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1368–1374.
- Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A Jr., et al. Detection of chromosomal *bla*(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:O623–O626.
- Foti M, Giacopello C, Bottari T, Fisichella V, et al. Antibiotic resistance of gram negatives isolates from loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) in the central Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 2009; 58:1363–1366.
- García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1725–1729.
- Guo YF, Zhang WH, Ren SQ, Yang L, et al. IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One* 2014; 9:1–7.
- Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, et al. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinoxid in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3332–3337.
- Hernandez J, Johansson A, Stedt J, Bengtsson S, et al. Characterization and comparison of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) resistance genotypes and population structure of *Escherichia coli* isolated from Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) and humans in Chile. *PLoS One* 2013; 8:1–9.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161–182.
- Liu D, Wilson C, Hearlson J, Singleton J, et al. Prevalence of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria associated with the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *J Zoo Wildl Med* 2013; 44:666–671.
- MLST Databases at UoW. Available at: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>. The University of Warwick, 2016.
- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2153–2162.
- Philippon L, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, et al. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2188–2195.
- Redondo C, Chalbaud A, Alonso G. Frequency and diversity of CTX-M enzymes among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates from Caracas, Venezuela. *Microb Drug Resist* 2013; 19:42–47.
- Rocha-Gracia R, Ruiz E, Romero-Romero S, Lozano-Zarain P, et al. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:169–171.
- Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, et al. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbor CTX-M-15 and CMY-2  $\beta$ -lactamases. *Vet J* 2015; 203: 315–319.
- Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, et al. *qnr*, *aac*(6')-Ib-cr and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: Genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 886–897.
- Sáenz Y, Vinué L, Ruiz E, Somalo S, et al. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sulI* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. *Vet Microbiol* 2010; 144:493–497.
- Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, et al. Changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:6003–6005.
- Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, et al. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One* 2013; 8:e77968.

- STATGRAPHICS® Centurion XVI User's Manual. StatPoint Technologies, Inc. USA, 2010. <http://www.statgraphics.net>
- Vinué L, Sáenz Y, Martínez S, Somalo S, et al. Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15:954–957.
- Whitten T, Bender JB, Smith K, Leano F, et al. Reptile-associated salmonellosis in Minnesota, 1996–2011. *Zoonoses Public Health* 2015; 62:199–208.
- Wiesner M, Fernández-Mora M, Cevallos MA, Zavala-Alvarado C, et al. Conjugative transfer of an IncA/C plasmid-borne *bla*<sub>CMY-2</sub> gene through genetic re-arrangements with an IncX1 plasmid. *BMC Microbiol* 2013; 13:1–17.
- Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, et al. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2716–2722.
- Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, Chim R, et al. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol* 2013; 4: 1–10.
- Zhao J, Chen Z, Chen S, Deng Y, et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4219–4224.

Address correspondence to:  
Rosa del Carmen Rocha-Gracia  
Posgrado en Microbiología  
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
Complejo de Ciencias, Edificio IC-11  
Ciudad Universitaria, Colonia San Manuel  
CP. 72570. Puebla, Pue  
México  
E-mail: rochagra@yahoo.com  
rosa.rocha@correo.buap.mx



Manuscript Number:

Title: ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy humans in México, including the subclone ST131-B2-O25:H4/H30-Rx.

Article Type: Short Communication

Keywords: *Escherichia coli*; Healthy humans; ST131-B2-O25:H4; CTX-M-14; CTX-M-15.

Corresponding Author: Dr. Rosa del Carmen Rocha-Gracia, PhD

Corresponding Author's Institution: Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Posgrado en Microbiología. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas

First Author: Gerardo Cortés-Cortés, MS

Order of Authors: Gerardo Cortés-Cortés, MS; Patricia Lozano-Zarain, PhD; Carmen Torres, PhD; Carla Andrea Alonso, MS; Ana María Ríos Torres, MS; Miguel Castañeda, PhD; Liliana López Pliego, MS; Armando Navarro, PhD; Rosa del Carmen Rocha-Gracia, PhD

Abstract: The spread of community-associated multidrug-resistant *Escherichia coli* clones is a serious public health concern. In this study, cefotaxime-resistant *E. coli* were recovered in 11 of 60 (18%) healthy volunteers. These isolates were multidrug-resistant and phenotypically ESBL-producing strains, and they were further characterized (one/sample). Genes encoding resistance to beta-lactams (*bla*CTX-M-15, *bla*CTX-M-14a, *bla*CTX-M-14b, *bla*OXA-1 and *bla*TEM-1b,); quinolones [*aac*(6')-Ib-cr, *qnr*B19], aminoglycosides [*aac*(3')-II] and tetracycline [*tet*(A), *tet*(B)] were detected among the 11 ESBL-producing *E. coli* by PCR and sequencing, as well as gene cassette arrays in class 1 (*dfr*A17-*aad*A5) or 2 (*dfr*A1-*sat*2-*aad*A1) integrons. Seven pulsotypes were identified among the isolates by PFGE-XbaI patterns and subsequently these ESBL-producing *E. coli* strains were distributed into phylogroups (number of isolates): A (2), B2 (4) and D (5). Seven sequence types were identified, four of them news (ST5060, ST5079, ST5080 and ST5081, associated with phylogroups A o D). The transference of an IncFIA plasmid of 140 kb carrying the *bla*CTX-M-15 gene was evidenced in the ST5060 strain. Four CTX-M-15-producing *E. coli* strains of phylogroup B2 belonged to the ST131 complex and IncFIB plasmids of 130 and 155 kb were detected in two of them. Multiple plasmid addiction systems were also found. Serotyping and *fim*H subtyping of ST131-B2 strains identified the ST131-B2-O25:H4/H30-Rx subclone. Additionally, this subclone and CTX-M-14-producing isolates were detected between residents living in the same household, suggesting a clonal dissemination. To our knowledge, this is the first detection of ST131-B2-O25:H4/H30-Rx subclone in healthy humans in Mexico, highlighting its dissemination in the community setting.